

Oskari Yli-Pelkonen

Parvorokkovirus IgG- ja IgM-EIA-testien tuotekehitys diagnostiikkaan

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

28.11.2013

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Oskari Yli-Pelkonen Parvorokkovirus IgG- ja IgM-EIA-testien tuotekehitys diagnos- tiikkaan 60 sivua + 6 liitettä 28.11.2013
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaaja(t)	Projektipäällikkö Antti Kokkonen Lehtori Tiina Soininen
<p>Ihmissen parvorokkovirus on yleinen maailmanlaajuisesti esiintyvä patogeeni. Parvorokkovirusinfektiot ovat yleisimpiä pienten lasten keskuudessa, aikuisista seropositiivisia on jo 30-60 % ja vanhuksista jopa 85 %. Parvorokkovirusinfektion on todettu aiheuttavan muun muassa parvorokkoa, niveltulehduksia, aplastista anemiasia, sikiön turvotusta ja sikiökuolemia. Akuutin parvorokkovirusinfektion diagnosoiminen on tärkeää etenkin raskaana olevilta naisilta, sikiön turvallisuuden kannalta.</p> <p>Tämän insinööritöön tarkoituksena oli kehittää Ani Labsystems Oy:lle ELISA-testit parvorokkoviruksen IgG- ja IgM-vasta-aineiden havaitsemiseksi potilasnäytteistä. Tarkoituksena oli käyttää mahdollisimman paljon Labsystemsien tuotannossa jo olevia reagensseja ja tuotantomenetelmiä. Työ tehtiin osaksi yhteistyössä Haartman Instituutin kanssa. Työn pohjana oli rekombinantti biotinyloitu parvorokkoviruksen VP2-rakenneproteiinista koostuva anti-geeni, joka oli tuotettu Haartman Instituutin virologian osastolla. Käytössä oli myös seeruminäytteitä, joista oli mittaustuloksia yhteistyölaboratorion parvorokkovirus ELISA-testeistä.</p> <p>IgG-testin kehitystyön lopussa saadut mittaustulokset tunnetuista näytteistä korreloivat hyvin yhteistyölaboratorion tulosten kanssa. Kun verrattiin kehitetyllä IgG-testillä 20 seeruminäytteestä saatuja tuloksia kilpailijoiden vastaavien testien tuloksiin, päästiin kahden kilpailijan valmistajan IgG-testien kanssa 95 %:n samankaltaisuuteen. Parvorokkovirus IgG-ELISA-testin tuotekehitys saatiin päätökseen. Seuraavana vaiheena projektissa on validointierien valmistus.</p> <p>IgM-testin tulokset korreloivat tunnetuilla näytteillä yhteistyölaboratorion tulosten kanssa hyvin, mutta kehitystyön edetessä huomattiin, että muutamasta Labsystemsien seerumivä- rastosta seulotusta näytteestä saatiin vääriä positiivisia tuloksia. Nämä näytteet olivat positiivisia kehitettävällä testillä, mutta negatiivisia kahdella kilpailijan testillä. Konjugaattia ja edelleen konjugaatin valmistajaa vaihtamalla päästiin eroon vääristä positiivisista reaktioista. Parvorokkovirus IgM-ELISA-testin tuotekehitystä ei tämän insinööritöön puitteissa saatu aivan valmiiksi. Kehitystyötä jatketaan vielä, kunnes tuote on valmis markkinoille.</p>	
Avainsanat	Parvorokkovirus, ELISA-testi, Tuotekehitys

Author(s) Title	Oskari Yli-Pelkonen Development of IgG and IgM-ELISA tests for human parvovirus B19
Number of Pages Date	60 pages + 6 appendices 28 November 2013
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructor(s)	Antti Kokkonen, Project Manager Tiina Soininen, Lecturer
<p>Human parvovirus B19 is a common pathogen that occurs worldwide. Human parvovirus infections are most common among young children, and 30-60 % of adults and up to 85 % of elderly are seropositive for human parvovirus. Human parvovirus is associated with erythema infectiosum, arthritis, aplastic anemia, hydrops fetalis and fetal deaths. Diagnosis of an acute human parvovirus infection is very important especially among pregnant women to ensure fetal safety.</p> <p>The aim of this thesis was to develop separate ELISA tests for the detection of human parvovirus IgG and IgM antibodies. The development project was made for Ani Labsystems Ltd. The intention was to use as many reagents and production methods as possible that were already used in other ELISA tests manufactured by Ani Labsystems. This project was done partially in co-operation with the Haartman Institute. The basis of this project was a recombinant biotinylated human parvovirus-like particle consisting of VP2 structural protein that was used as an antigen. The antigen was produced at the Haartman Institute's Department of Virology. Known serum samples that had been tested in the co-operation laboratory were used.</p> <p>When testing the final version of the IgG test, an excellent correlation with results from the co-operation laboratory was achieved for known serum samples. When tested with 20 serum samples, a similarity of 95 % was achieved when compared to two competitors' human parvovirus IgG-ELISA-tests. The research and development phase of the IgG-ELISA test was completed and the next step will be production of validation lots.</p> <p>When tested with known samples, the results from the developed IgM test correlated very well with the co-operation laboratory's results. However, it turned out during the development process that the IgM test under development gave false positive results with several unknown serum samples. These samples were positive with the IgM test under development but negative with IgM tests manufactured by two different competitors. These false positive reactions were erased by changing the conjugate used and also the manufacturer of the conjugate. The IgM-ELISA test was not quite completed during this thesis project, but the development process will continue until the IgM test is ready.</p>	
Keywords	Human parvovirus B19, ELISA-test, R&D

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Parvovirukset	2
2.1	Ihmisen parvorokkovirus B19	2
2.2	B19V:n genotyypit	5
2.3	Esiintyvyys ja immuunivaste	5
3	Ihmisen parvorokkoviruksen aiheuttamat taudit	6
3.1	Parvorokko (Erythema Infectiosum)	7
3.2	Aplastinen kriisi ja anemia	7
3.3	Raskauden aikainen B19V infektio	7
3.4	Niveltulehdukset	8
3.5	Muita oireita	9
3.6	Parvorokkovirusinfektion hoito	9
4	Parvorokkovirusinfektion diagnostiikka	10
4.1	Parvoviruksen kaltaiset partikkelit	11
4.2	Epäsuora IgG-ELISA-testi ihmisen parvorokkovirukselle	12
4.3	μ-kaappaus-IgM-ELISA-testi ihmisen parvorokkovirukselle	13
5	Työn tarkoitus ja tavoitteet	15
6	Materiaalit ja menetelmät	16
6.1	Seeruminäytteet	16
6.2	B19V-IgG-testin komponenttien optimointi	19
6.3	B19V-IgM-testin komponenttien optimointi	21
7	Tulokset	23
7.1	IgG-ELISA-testi	23
7.1.1	Mikrotitterilevy	24
7.1.2	Konjugaatin valinta	28
7.1.3	Näyte-, kontrolli- ja pesupuskuri	30
7.1.4	Kontrolliseeruminäytteet	33
7.1.5	Inkubaatioajat ja -lämpötilat	34

7.1.6	Konjugaatin säätö ja raja-arvo	35
7.1.7	Vertailu kilpailijan testiin	38
7.2	IgM-ELISA-testi	41
7.2.1	Konjugaatin valinta	41
7.2.2	Antigeenin ja konjugaatin lisäys samaan aikaan sekä inkubointiajat	44
7.2.3	Näytelaimennospuskuri ja pesupuskuri	46
7.2.4	Antigeenin lyofilisointi	48
7.2.5	Vertailu kilpailijoiden testeihin ja väärät positiiviset tulokset	51
7.2.6	Väärrien positiiviset näytteet ja streptavidiini-konjugaatti	52
7.2.7	Kontrolliseeruminäytteet	52
8	Yhteenveto	53
8.1	IgG-testi	53
8.2	IgM-testi	54
	Lähteet	55

Liitteet

Liite 1. Antigeenin testaus: seeruminäytteet ja mittaustulokset

Liite 2. Konjugaatin vaihdon testaus: seeruminäytteet ja mittaustulokset

Liite 3. IgG-HRP-konjugaatin säädön testaus: seeruminäytteet ja mittaustulokset

Liite 4. IgG-testin vertailu kilpailijoiden vastaaviin testeihin

Liite 5. IgM-testin antigeenin ja konjugaatin samanaikainen lisäys

Liite 6. IgM-testillä saatujen väärrien positiivisten näytteiden mittaustuloksia

Lyhenteet

B19V	Ihmisen parvorokkovirus B19
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , naudan seerumin albumiini
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HRP	<i>Horseradishperoxidase enzyme</i> , piparjuuripeoksidaasientsyymi
IgG	Immunoglobuliini G
IgM	Immunoglobuliini M
IU	<i>International unit</i> , kansainvälinen yksikkö
NS1	<i>Non-structural protein 1</i> , ei rakenteellinen proteiini 1
PBST	<i>Phosphate Buffer Saline + Tween 20</i> , fosfaattipuskuri suolaliuoksella, johon on lisätty Tween 20:tä
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , polymeerasiketjureaktio
TMB	<i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i> , tetrametyylibentsidiini
VLP	<i>Virus-like particle</i> , viruksen kaltainen partikkeli
VP1, VP2	<i>Virus protein 1, Virus protein 2</i> , parvorokkoviruksen rakenneproteiinit 1 ja 2
WHO	<i>World Health Organization</i> , maailman terveysjärjestö

1 Johdanto

Tämä insinöörityö tehtiin Ani Labsystems Oy:n tuotekehityslaboratoriossa Vantaan Petikossa. Työ tehtiin osaksi yhteistyössä Haartman Instituutin virologian osaston tutkimusryhmän kanssa.

Ihmisen parvorokkovirus on maailmanlaajuisesti esiintyvä yleinen taudinaiheuttaja. Suurin osa parvorokkovirusinfektioista ajoittuu lopputalveen ja kevääseen. Parvorokkoviruksen on todettu aiheuttavan muun muassa parvorokkoa, niveltulehduksia, anemiasia, sikiön turvotusta ja sikiökuolemia. Parvorokkovirusinfektiot ovat yleisimpiä pienten lasten keskuudessa, joten esimerkiksi raskaana olevat, lasten kanssa työskentelevät, naiset kuuluvat parvorokkovirusinfektion riskiryhmään sen sikiölle aiheuttamien komplikaatioiden vuoksi. Akuutin parvorokkovirusinfektion diagnosoiminen onkin tärkeää juuri raskaana olevilla naisilla. Ihmisen parvorokkoviruksen diagnostiikassa käytetään yleisimmin serologisia testejä. Yleensä mitataan parvorokkoviruksen IgG- ja IgM-vasta-aineiden määrää.

Tämän insinöörityön tavoitteena oli kehittää Ani Labsystems Oy:lle ELISA-testi ihmisen parvorokkovirusinfektion diagnosoimiseksi. Tarkoituksena oli kehittää kvalitatiivinen testi sekä immunoglobuliini G (IgG) että immunoglobuliini M (IgM) vasta-aineiden tunnistamiseksi potilasnäytteestä. Testit oli tarkoitus muokata yhteistyölaboratorion vastaavien parvorokkovirustestien pohjalta Ani Labsystemsien tarpeisiin ja tuotantomenetelmiin sopiviksi. Tavoitteena oli kehittää spesifinen, herkkä ja toimiva kaupallinen diagnostiikkatuote.

2 Parvovirukset

Parvovirukset kuuluvat pienimpiin DNA:ta sisältäviin nisäkässoluja infektioiviin viruksiin. Parvovirukset ovat halkaisijaltaan vain 18–26 nm kokoisia ja rakenteeltaan yksinkertaisia. Ne koostuvat vaipattomasta ikosahedraalisesta kapsidista ja lineaarisesta yksijuosteisesta DNA:sta. Parvovirusten nimi tulee latinan kielen sanasta *parvum*, joka tarkoittaa pientä. Parvovirusten molekyylipaino on $5,5\text{--}6,2 \times 10^6$ Da ja yksijuosteisen DNA genomin pituus 4000–6000 emästä (Söderlund 1996). Yksinkertaisen ja vaipattomat rakenteensa vuoksi parvovirukset kestävät hyvin fyysistä rasitusta, eikä niitä voi inaktivoida esimerkiksi orgaanisilla liuottimilla, koska parvovirusten kapsidit eivät sisällä ollenkaan lipidejä (Hokynar 2007).

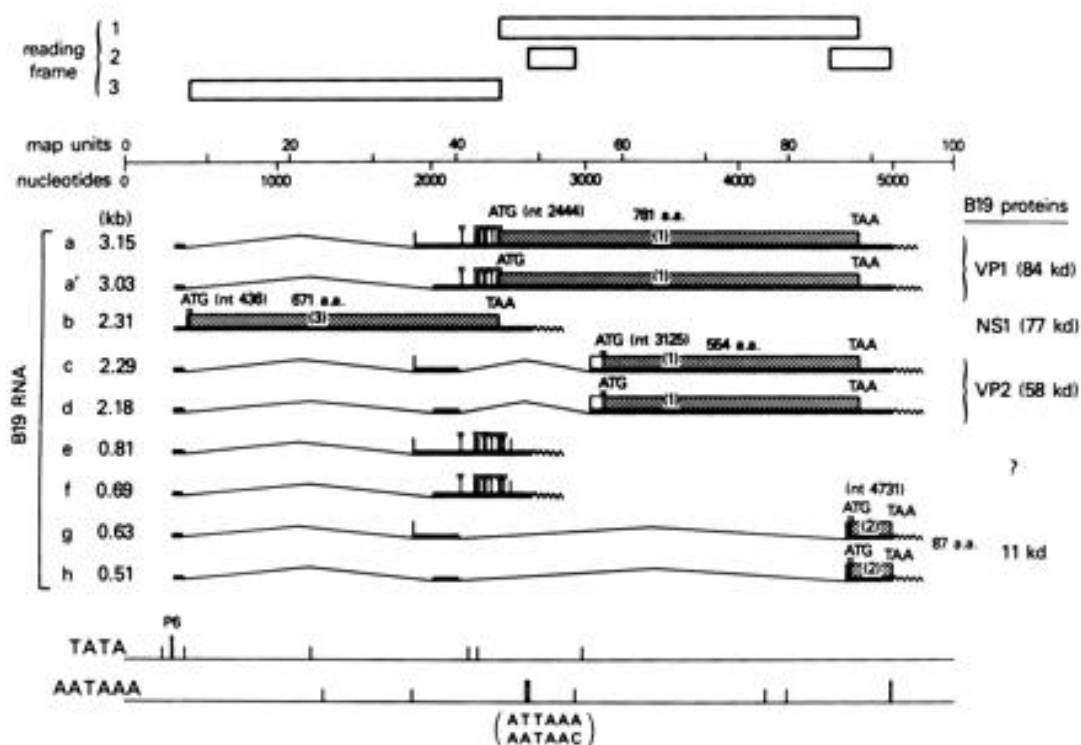
Parvovirukset kuuluvat *Parvoviridae*-heimoon, joka jakautuu kahteen alaheimoon *Parvovirinae* ja *Densovirinae*. *Parvovirinae*-alaheimon virukset infektioivat selkärangkaisia ja *Densovirinae*-alaheimon virukset hyönteisiä. *Parvovirinae*-alaheimo jakautuu vielä viiteen sukuun: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* ja *Bocavirus*. (ICTV 2011.) Ihmisen parvorokkovirus (parvovirus B19) kuuluu *Erythrovirus*-sukuun, sillä se replikoituu vain erytrosyyttisolujen esivaiheissa (Heegard & Brown 2002).

2.1 Ihmisen parvorokkovirus B19

Ihmisen parvorokkovirus B19 (human parvovirus B19, B19V) havaittiin ensimmäisen kerran vuonna 1975 testattaessa B-hepatiittia terveiden verenluovuttajien seeruminäytteistä. Virus löydettiin B-testipaneelin näytteestä numero 19, jonka mukaan se myös nimettiin. Löydettäessä B19V:tä ei osattu yhdistää mihinkään tiettyyn sairauteen. (Cosart ym. 1975). Nykyään ihmisen parvorokkovirusinfektio on yhdistetty muun muassa parvorokkoon, aplastiseen anemiaan, niveltulehduksiin, sikiön turvotukseen ja si-kiökuolemiin.

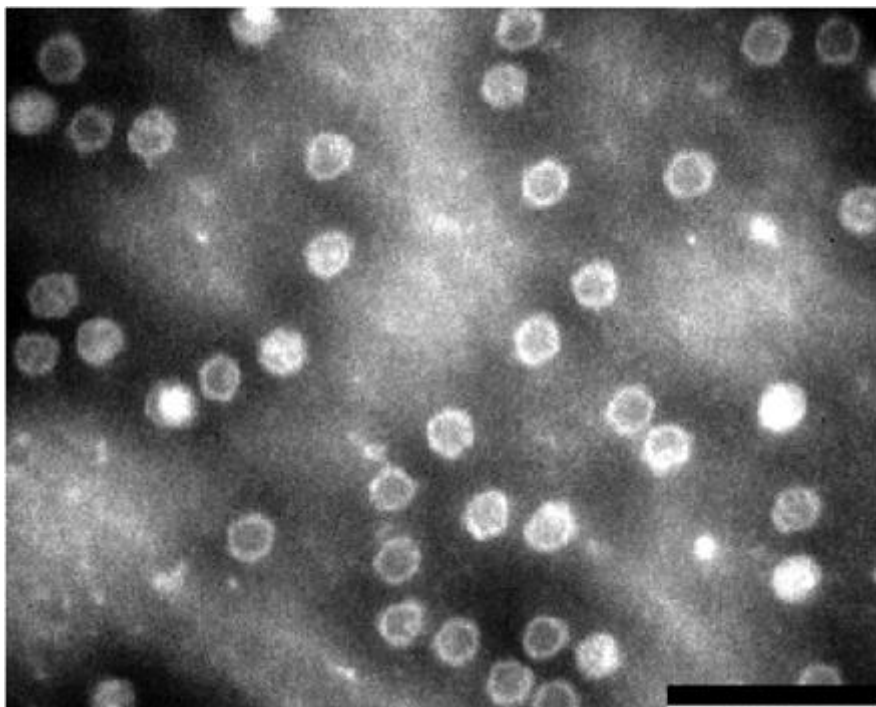
B19V on halkaisijaltaan noin 22 nm ja sen molekyylipaino on noin $5,6 \times 10^6$ Da. Viruksesta noin 80 % koostuu kapsidista ja loput 20 % DNA:sta. B19V on stabiili 60 minuuttia 56 °C:ssa ja kestää pH:n vaihtelua välillä 3–9. (Hokynar 2007: 15.)

B19V:n genomi koostuu 5596 emäksestä, jotka muodostavat lineaarisen yksijuosteisen DNA:n (Cotmore ym. 1984). B19V:n genomin molemmissa päissä on parvovirusille ominainen 365 emäksen palindrominen alue, joka muodostaa hiusneularakenteen. B19V:n palindrominen alue on kuitenkin huomattavasti pidempi verrattuna muihin parvovirusiin. Näiden palindromisten alueiden muodostamat hiusneularakenteet toimivat apuna parvovirusten replikaatiossa. (Deiss ym. 1990).



Kuva 1. Parvorokkoviruksen transkriptio kartta (Ozawa ym. 1987).

B19V:n genomi koodittaa kolmea merkittävää proteiinia, joista kaksi ovat rakenneproteiineja VP1 (83 kDa) ja VP2 (58 kDa), sekä yhtä ei rakenteellista proteiinia, NS1:tä (77 kDa) (Cotmore ym. 1986; kuva 1). Näiden kolmen proteiinin lisäksi B19V:n genomi koodittaa myös kahta pienempää proteiinia (Ozawa ym. 1987; kuva 1). B19V:n kapsidi koostuu kahdesta rakenneproteiinista VP1:stä ja VP2:sta, jotka muodostavat 60 rakenneproteiinin ikosahedraalisen muodon. VP2 on vallitseva rakenneproteiini muodostaen noin 96 % kapsidista. VP1 muodostaa loput 4 % kapsidin rakentesta. (Ozawa & Young 1987; Hokynar 2007: 15.) Kahden rakenneproteiinin aminohapposekvenssit ovat muuten täysin samanlaisia, mutta VP1:ssä on 227 aminohapon pituinen osa, jonka on havaittu työntyvän ulospäin viruskapsidista. Tätä 227 aminohapon pituista osaa kutsutaan VP1 uniikkialueeksi (VP1u). (Kawase ym. 1995; Hokynar 2007: 15.)



Kuva 2. Elektronimikroskooppikuva parvorokkoviruskapsideista. Oikean alanurkan mittakaavan pituus 100 nm. (Heegaard & Brown 2002).

B19V replikoituu punasolujen esiasteiden tumassa luuytimessä (Ozawa ym. 1986), sikiön maksassa sekä muissa nopeasti jakautuvissa hematopoieettisissa soluissa (Söderlund 1996: 22). Lyhyen genominsa vuoksi B19V joutuu turvautumaan kokonaan isäntäsolun replikaatiomekanismiin ja polymeraasien tuotantoon. B19V:n oletetaan käyttävän replikaation alukkeina genominsa päissä olevista palindromisista alueista muodostuvia hiusneulasrakenteita replikaation helpottamiseksi. (Norja 2012: 15,16; Hokinär 2007: 16,17.)

B19V:n reseptoreina toimivat globosidit eli P-antigeenit (Brown ym. 1993), joita löytyy punasolujen ja niiden esiasteiden lisäksi myös muiden solukkojen kuten nivelten, istukan endoteelisolukkon ja sikiön sydänsolujen pinnoilta (Brown ym. 1994; de Jong ym. 2006). Ihmisillä, joilta puuttuu P-antigeeni, on luontainen immunitetti B19V:sta vastaan (Brown ym. 1994).

2.2 B19V:n genotyypit

Ihmisen B19 viruksesta tunnetaan kolme eri genotyyppiä. Genotyyppi 1 on ensimmäiseksi löydetty B19V, joka on yleisin kaikista kolmesta genotyypistä. Genotyypin 2 virus (A6) löydettiin vuonna 2002 HIV-positiiviselta potilaalta, joka kärsi kroonisesta anemiasta (Nguyen ym. 2002). Genotyypin 3 virus (V9) löydettiin ensimmäisen kerran vuonna 1999 aplastisesta anemiasta kärsivältä lapselta (Nguyen ym. 1999). Tämän jälkeen genotyypin 3 virusta on löydetty endeemisenä Ghanasta sekä Brasiliasta.

B19V:n eri genotyyppien genomien koodaavat alueet eroavat toisistaan noin 10 %. Suurimmat erot genomien välillä löytyvät promoottorista p6, jossa genotyypit eroavat toisistaan noin 20 %. (Hokynar ym. 2002). Tämä ei kuitenkaan näytä vaikuttavan eri genotyyppien kykyyn infektoida B19V:lle ominaisia soluja (Blümel ym 2005; Ekman ym. 2007).

Antigeenisiltä ominaisuuksiltaan B19V:n eri genotyypit ovat, genomien eroista huolimatta, samantyyppisiä. Kun eri genotyyppisiä on testattu tutkimuksissa EIA-testeillä, joissa on käytetty antigeeninä eri genotyyppien rekombinantteja viruksen kaltaisia partikkeleita, on niiden havaittu reagoivan ristiin toistensa kanssa (Heegaard ym. 2002; Ekman ym. 2007). Eri genotyypeillä ei ole myöskään havaittu olevan genotyyppispesifisiä oireita, vaan kaikilla genotyypeillä ilmenevät oireet ovat samankaltaisia (Nguyen ym. 1999; Servant ym. 2002; Sanabani 2006).

Uusien molekyylibiologisten seulontamenetelmien myötä, on löydetty muutamia uusia parvovirusia. Nämä äskettäin löydetyt parvovirukset on nimetty ihmisen bocaviruksiksi. Ensimmäinen ihmisen bocavirus 1 löydettiin vuonna 2005 lapsilta, jotka kärsivät hengitystieinfektioista (Allander ym. 2005). Muut kolme bocavirusta, bocavirukset 2–4, on löydetty tämän jälkeen (Kapoor ym. 2009; Arthur ym. 2009; Kapoor ym. 2010).

2.3 Esiintyvyys ja immuunivaste

Ihmisen parvovirus B19:sta esiintyy yleisesti maailmanlaajuisesti. B19V-infektiot ovat yleisimpiä pienten lasten keskuudessa, joten IgG-vasta-aineita B19V:lle löytyy 15–60 %:lla nuorista ja 30–60 %:lla aikuisista. Vanhuksista seropositiivisia on jopa yli 85 %.

Suurin osa parvorokkovirusinfektioista tapahtuu lopputalven ja kevään aikana. Epidemioita tavataan 3–4 vuoden välein. (Heegaard & Brown 2002)

Parvorokkovirus tarttuu yleisimmin hengitysteitse pisaratartuntana, mutta voi tarttua myös verituotteiden, kuten suonensisäisten immunoglobuliinien välityksellä (Heegaard & Brown 2002; Erdman ym. 1997). B19V voi tarttua myös äidiltä sikiölle istukan kautta.

Parvorokkoviruksen DNA:ta havaitaan veressä yleensä noin kuusi päivää infektion jälkeen ja DNA:n määrä pysyy selvästi erotettavissa noin viikon verran. On tosin huomattu, että B19V-DNA:ta voidaan havaita ihmisessä hyvin pienissä määrissä usean kuukauden ajan infektiosta (Enders ym. 2006). IgM-vasta-aineita B19V:ta kohtaan alkaa kehittyä 10–12 päivää infektion jälkeen ja IgG-vasta-aineita noin kaksi viikkoa infektiosta. IgM-vasta-aineet pysyvät erotettavalla tasolla noin kolmen kuukauden ajan. IgG-vasta-aineet pysyvät elimistössä lopun elämää ja suojaavat toissijaisilta infektiolta. (Anderson ym. 1985; Anderson L. J. ym. 1986; Heegaard & Brown 2002).

Parvorokkoviruksen on havaittu persistoituvan ihmisen eri kudoksiin pitkiksikin ajoiksi infektion jälkeen. Infektion jälkeen B19V:n DNA:ta on löydetty muun muassa luuytimeistä, iholta, maksasta sekä nivelistä. DNA:ta on löydetty sekä oireilevilta että oireettomilta potilailta ja ainakin nivelkudoksista B19V:sta on löydetty kokonaisina genomeina. B19V voi persistoitua kudoksiin vuosiksi tai jopa loppuelämän ajaksi. (Hokynar 2007; Cassinotti ym. 1997; Hokynar ym. 2000; Norja ym. 2006)

3 Ihmisen parvorokkoviruksen aiheuttamat taudit

Ihmisen parvorokkovirusinfektion oireet ovat yleensä lieviä ja suuri osa infektiosta on oireettomia (Heegaard & Brown 2002; Norja 2012). Kuitenkin retikulosyyttien määrän lasku ja lievä hemoglobiinin putoaminen ovat erittäin yleisiä B19V-infektion aikana (Anderson ym. 1985). Joissakin tapauksissa B19V-infektion oireet saattavat muistuttaa normaalia vilustumista. B19V:een yhdistetyt oireet ilmenevät yleensä kahdessa erillisessä vaiheessa. Ensimmäinen vaihe on yleensä viremian aikana ja toinen muutaman päivän päästä siitä, IgM-vasta-ainetason noustessa. Ensimmäisessä vaiheessa oireet ovat usein kuumeilua ja epäspesifisiä oireita, kuten huonovointisuutta ja pääkipua. B19V:lle tyypillisiä oireita havaitaan yleensä vasta toisessa vaiheessa, jonka vuoksi

oireiden jo alettua ei potilaista yleensä enää löydetä B19V-DNA:ta. (Heegaard & Brown 2002; Anderson ym. 1985). Nykyään ihmisen parvovirus B19 on yhdistetty suureen määrään erilaisia tauteja, joista yleisimmistä seuraavassa lisää.

3.1 Parvorokko (Erythema Infectiosum)

Vuonna 1984 todettiin B19V:n aiheuttavan parvorokkoa eli niin kutsuttua viidettä tautia (erythema infectiosum), joka on B19V:n yleisimmin aiheuttama tauti. Parvorokkoa esiintyy useimmiten pienillä lapsilla, mutta myös aikuiset voivat sairastaa parvorokon. (Anderson ym. 1984). Parvorokko ilmenee punoittavana ihottumana, joka yleensä alkaa ensimmäisenä poskilta ja levittyy sen jälkeen raajoihin ja vartaloon. Ihottuma ilmestyy yleensä kahdesta kolmeen viikkoa infektion jälkeen ja paranee ilman hoitoa vajaassa viikossa. Ihottuman lisäksi parvorokon aikana potilaalla saattaa esiintyä kuumetta, pääkipua, pahoinvointia sekä nivelkipuja. (Anderson ym. 1984; Anderson ym. 1985; Heegaard & Brown 2002)

3.2 Aplastinen kriisi ja anemia

Aplastinen kriisi on ensimmäinen oire, joka yhdistettiin B19V infektiin vuonna 1981. Tällöin sirppisoluanemiaa sairastavalta lapselta löydettiin B19V:n vasta-aineita. Jatko-tutkimuksissa löydettiin B19V:n vasta-aineita myös muilta lapsilta, jotka kärsivät aplastisesta kriisistä sirppisoluanemian aikana. (Pattison ym. 1981). Aplastisen kriisin aikana punasolujen määrä veressä vähenee rajusti. Hemolyyttistä anemiaa sairastavien lisäksi myös ihmisillä, joilla on vähentynyt punasolujen tuotanto tai lisääntynyt punasolujen tuhoutuminen, on riski B19V:n aiheuttamaan aplastiseen kriisiin (Heegaard & Brown 2002)

3.3 Raskauden aikainen B19V infektio

Raskaana olevista naisista noin 35–45 %:lla ei ole B19V:n vasta-aineita ja ovat näin alttiita parvorokkovirusinfektioille (de Jong ym. 2006; Alanen ym. 2005). Normaalisti akuutin raskauden aikaisen B19V infektion yleisyys on noin 1–2 %, mutta epidemian aikana infektioiden yleisyys voi olla jopa yli 10 % (de Jong ym. 2006; Valeur-Jensen

ym. 1999). B19V voi kulkeutua infektoituneelta äidiltä sikiölle istukan kautta. B19V-infektoi sikiön noin 30 %:ssa tapauksista ja infektion aiheuttamien komplikaatioiden riski on suurin raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana (Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease 1990; de Jong ym. 2006; Heegaard & Brown 2002). Riski B19V:n kulkeutumisesta äidiltä istukan kautta sikiölle vähenee raskauden edetessä, koska B19V:n reseptoreina toimivien globosidien määrä vähenee huomattavasti istukassa raskauden edetessä (Jordan ym. 1999).

Koska parvorokkovirusinfektiot ovat erittäin yleisiä 5–7-vuotiaiden lasten keskuudessa, kuuluvat raskaana olevat, pienten lasten kanssa työskentelevät, kuten ala-asteen opettajat ja päivähoiton työntekijät, parvorokkovirusinfektion riskiryhmään. Suurentunut parvorokkovirusinfektion riski on myös raskaana olevilla naisilla, joilla on jo pieniä lapsia kotona. (Valeur-Jensen ym. 1999; Cartter ym. 1991).

Sikiön parvorokkovirusinfektio

Parvorokkovirus voi infektoida sikiön istukan kautta, jos raskaana olevalla naisella on akuutti B19V-infektio. Sikiön B19V-infektio on yhdistetty sikiön turvotukseen (hydrops fetalis), sikiön anemiaan sekä sikiökuolemiin. (Brown ym. 1984; Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease 1990; Tolfvenstam ym. 2001). B19V:n aiheuttaman sikiön turvotuksen riski raskauden aikana on noin 4 % ja sikiökuoleman riski sikiön infektoituessa on 6–10 %. Sikiökuoleman riski on suurin, kun äidin B19V-infektion tapahtuu ennen 20:nnettä raskausviikkoa. (Enders ym. 2004; Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease 1990). Sikiön B19V:n aiheuttamista komplikaatioista noin 95 % havaitaan 12 viikkoa äidin akuutin infektion jälkeen (Enders ym. 2006). Toistaiseksi ainut tapa hoitaa sikiön B19V-infektion aiheuttamaa turvotusta on kohdun sisäinen punasolujen siirto, jonka on vakavissa tapauksissa huomattu vähentävän sikiökuoleman riskiä huomattavasti (Enders ym. 2004; De Jong ym. 2006).

3.4 Nivel tulehdukset

Vuonna 1985 parvovirus B19 yhdistettiin nivel tulehduksiin kahdessa eri tutkimusryhmässä (White ym. 1985; Reid ym. 1985). B19V:n aiheuttamat nivel tulehdukset ovat huomattavasti yleisimpiä aikuisten kuin lasten keskuudessa. Naisilla nivel tulehduksia

esiintyy 60 %:ssa tapauksista ja miehillä 30 %:ssa tapauksista. B19V:n aiheuttamista niveltulehduksista kärsivistä noin puolella oireet täyttävät reumatismin määritelmät. (Heegaard & Brown 2002; Anderson ym. 1985)

3.5 Muita oireita

On havaittu, että sekä oireilevilla että oireettomilla B19V-infektion saaneilla ihmisillä retikulosyyttien määrä putoaa voimakkaasti olemattomiin viremien loppupuolella. Tämä viittaa siihen, että normaaleilla terveillä yksilöillä punasolujen tuotanto häiriintyy tai keskeytyy hetkellisesti B19V:n vaikutuksesta. Samaan aikaan, retikulosyyttien määrän putoamisen kanssa, myös hemoglobiinin määrä putoaa merkittävästi. B19V-infektion saaneilla myös valkosolujen määrä putoaa selkeästi. (Anderson ym. 1985).

B19V:n koodittaman proteiinin NS1:n on havaittu aiheuttavan apoptoosia erytroidisoluissa ja hepatosyyttisoluisissa. Suurin osa maksasta koostuu hepatosyyttisoluisista. B19V-infektion onkin ajateltu aiheuttavan akuutteja maksan sairauksia tappamalla maksan solukkoa. (Moffatt ym. 1998; Poole ym. 2004).

3.6 Parvorokkovirusinfektion hoito

Parvorokkovirukselle ei ole olemassa varsinaista lääkettä tai rokotetta, ja suurin osa parvorokkovirusinfektioista paranee itsestään. Kuitenkin B19V:n infektoimia sikiöitä, joilla on merkkejä anemiasta tai sikiön turvotuksesta, voidaan hoitaa punasolujensiirroilla tai suonensisäisillä immunoglobuliineilla. Myös immuunivajavaisia ihmisiä, joilla on krooninen B19V-infektio tai aplastista anemiam sairastavia ihmisiä voidaan hoitaa punasolujen siirroilla sekä immunoglobuliineilla. Ensimmäisen parvorokkovirusinfektion jälkeen syntyvät IgG-vasta-aineet suojaavat toissijaisilta infektoilta loppuelämän ajan. (Enders ym. 2004; Norja 2012; Heegaard & Brown 2002)

4 Parvorokkovirusinfektion diagnostiikka

Ihmisen parvorokkoviruksen diagnosoimiseen potilasnäytteestä voidaan käyttää muun muassa elektronimikroskopiaa, serologisia testejä tai PCR-menetelmiä. Nykyään akuutin B19V-infektion diagnosointiin käytetään tyypillisesti IgM-ELISA-testiä, jonka rinnalla voidaan käyttää myös PCR-menetelmää. Vanhan B19V-infektion määrittäminen tehdään pääsääntöisesti pelkästään IgG-ELISA-testillä, mutta IgG-testin rinnalla voidaan käyttää myös PCR-menetelmää. Perinteisten IgM- tai IgG-ELISA -testien lisäksi voidaan käyttää myös IgG-aviditeetti-ELISA-testiä sekä epitooppityyppispesifistä IgG-ELISA-testiä (ETS-ELISA). (Norja 2012).

ETS-ELISA-testiä sekä IgG-aviditeetti-ELISA-testiä voidaan käyttää akuutin infektion erottamisessa vanhasta infektiosta. Aviditeetillä tarkoitetaan kahden molekyylin, kuten antigeenin ja vasta-aineen, sitoutumisvoimakkuutta toisiinsa (Hayat 2006). Syntyessään uuden IgG-vasta-aineen aviditeetti on matala. Vanhetessaan IgG-vasta-aineen aviditeetti kasvaa. Aviditeettitestissä IgG-vasta-aineiden annetaan ensin sitoutua antigeeniin, jonka jälkeen lisätään proteiineja denaturoivaa ainetta. IgG-vasta-aineet, joilla on heikko aviditeetti, irtoavat antigeenistä. Vastaavasti IgG-vasta-aineet, joilla on suuri aviditeetti, pysyvät sitoutuneina antigeeniin. Matala IgG-aviditeetti kuvaa akuuttia infektiota ja suuri aviditeetti vanhaa immunitettiin. Parvorokkoviruksen diagnostiikassa käytetään IgG-aviditeettitestissä hyväksi rekombinantteja VP1:tä sisältäviä antigeenejä. Tutkimuksissa on huomattu, että B19V:lla IgG-aviditeetin mittaaminen pelkästään VP2-rakenneproteiinista koostuvilla antigeeneillä ei anna luotettavia tuloksia. (Söderlund ym. 1995a).

Tutkimuksissa on myös huomattu, että akuutin infektion aikaiset tuoreet B19V-IgG-vasta-aineet tunnistavat B19V:n rakenneproteiineista koostuvan antigeenin sekä konformaationaalisessa että denaturoidussa eli lineaarisessa muodossa. Vanhetessaan B19V-IgG-vasta-aineet eivät kuitenkaan enää tunnistavat ja sitoudu lineaarisiin antigeeneihin, mutta tunnistavat normaalisti konformaationaaliset antigeenit. (Söderlund ym. 1995b). Tämän tiedon pohjalta on voitu suunnitella testi, jossa käytetään lineaarisessa muodossa olevaa lyhyttä peptidiketjua, joka tunnistaa spesifisti akuutin vaiheen IgG-vasta-aineet (Kaikkonen ym. 1999).

Varsinkin raskaana olevien naisten mahdollisen parvorokkovirusinfektion ajoittaminen on tärkeää sikiön turvallisuuden kannalta. Äidin akuutin B19V-infektion ei ole havaittu aiheuttavan sikiön turvotusta, jos ensisijainen infektiio on ollut ennen sikiön hedelmöitystä (Enders ym 2006). Tällöin kuitenkin B19V-IgM-vasta-aineet saattavat olla vielä koholla raskauden alkuvaiheessa. Toisaalta B19V:n IgM-vasta-ainepitoisuudet saattavat tippua nopeastikin detektiorajan alle, jolloin raskauden aikainen B19V-infektio voi jäädä diagnosoimatta ja sikiön asianmukainen hoito mahdollisen turvotuksen aikana saattaa viivästyä (Enders ym. 2008). Raskauden aikaista B19V-infektiota epäiltäessä voisikin infektion ajankohdan määrittämisessä olla hyödyksi käyttää myös PCR-testiä serologisten testien rinnalla. Näin voitaisiin välttää muun muassa ylimääräisiltä sikiön ultraäänitutkimuksilta ja äidin turhalta huolestumiselta tai sikiön hoidon aloituksen viivästymiseltä, jos ensisijainen infektiio on ollut ennen hedelmöitystä. (Enders ym. 2006; Enders ym. 2008)

Immuunivajeisilla ihmisillä, joilla vasta-aineiden tuotto on tyrehtynyt tai se on hyvin heikkoa, serologisia testejä tai kvalitatiivista PCR-testiä ei voi käyttää B19V-infektion diagnosoimiseen. Tällaisissa tapauksissa infektion ajoittamiseen voidaan käyttää kvantitatiivista PCR-testiä, koska B19V-DNA:n tiedetään pysyvän elimistössä pieninä pitoisuuksina kuukausia. (Enders ym. 2006; Norja 2012)

4.1 Parvoviruksen kaltaiset partikkelit

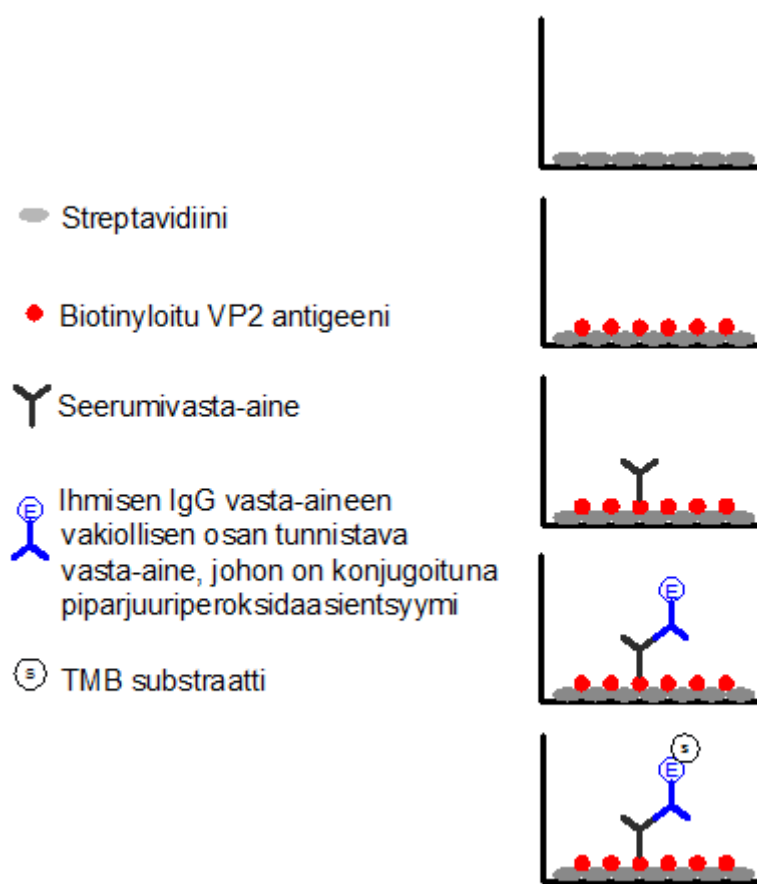
Parvorokkovirusta on vaikea kasvattaa suurissa määrissä käyttäen perinteisiä menetelmiä. Tämän vuoksi on kehitetty menetelmiä, joilla voidaan tuottaa suuria määriä rekombinantteja parvorokkoviruksen rakenneproteiineista koostuvia tyhjiä kapsideja. (Kajigaya ym. 1989). Suuria määriä tyhjiä B19V-kapsideja voidaan tuottaa rekombinantteilla baculoviruksilla infektoiduissa *Spodoptera frugiperda* -soluissa (sf-9-soluja) käyttäen hyödyksi baculoviruksen proteiinien ilmentämismekanismeja (Brown ym. 1990; Kajigaya ym. 1991; Kaikkonen ym. 1999). Näin tuotetut, joko rakenneproteiineista VP1 ja VP2 tai pelkästään rakenneproteiini VP2:sta koostuvat, tyhjät B19V-kapsidit ovat morfologisesti, antigeenisesti sekä immunogeenisesti samanlaisia kuin luonnossa esiintyvät parvorokkovirukset (Kajigaya ym. 1991; Brown ym. 1991). Näin ollen tyhjiä B19V-kapsideja voidaan käyttää antigeenina muun muassa IgG- sekä IgM –ELISA-testeissä (Brown ym. 1990; Kajigaya ym. 1991; Koch 1995).

Äskettäin on myös kuvattu B19V-viruksen kaltaisten partikkelien *in vitro* -tuotanto. VP2-rakenneproteiinia oli ensin tuotettu *Escherichia coli* -bakteerissa, jonka jälkeen ne on puhdistettu ja koottu viruksen kaltaisiksi partikkeleiksi solun ulkopuolella. (Sánchez-Rodríguez ym. 2012).

4.2 Epäsuora IgG-ELISA-testi ihmisen parvorokkovirukselle

Epäsuorassa B19V-IgG-ELISA-testissä seeruminäytteen B19V-IgG vasta-aine tunnistaa testikaivon pohjaan kiinnitetyn VP2-rakenneproteiinista koostuvan biotinyloidun antigeenin. Tämän jälkeen lisätään ihmisen IgG-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistava vasta-aine, joka on liitetty yhteen HRP-entsyymin kanssa (IgG-HRP-konjugaatti). IgG-HRP-konjugaatti kiinnittyy B19V-IgG-vasta-aineeseen. Konjugaatin jälkeen kaivoon lisätään TMB-substraatti, joka hajotessaan HRP-entsyymin vaikutuksesta, saa aikaan sinisen värin. Lopuksi reaktio lopetetaan lisäämällä laimeaa happoa, jolloin kuoppaan muodostunut väri muuttuu keltaiseksi. Värin voimakkuus on suoraan verrannollinen seeruminäytteen sisältämän B19V-IgG-vasta-aineen määrään. Kuoppaan muodostuneen värin absorbanssi mitataan spektrofotometrillä aallonpituudella 450 nm. Epäsuoran IgG-ELISA-testin toimintaperiaate on esitetty kuvassa 3.

Ennen biotinyloidulla antigeenillä päällystämistä kuoppalevyt täytyy päällystää streptavidiinilla, koska tutkimuksissa on havaittu, että VP2-rakenneproteiinista koostuva antigeeni denaturoituu, jos se kiinnitetään suoraan polystyreenilevyille (Söderlund ym. 1995b).



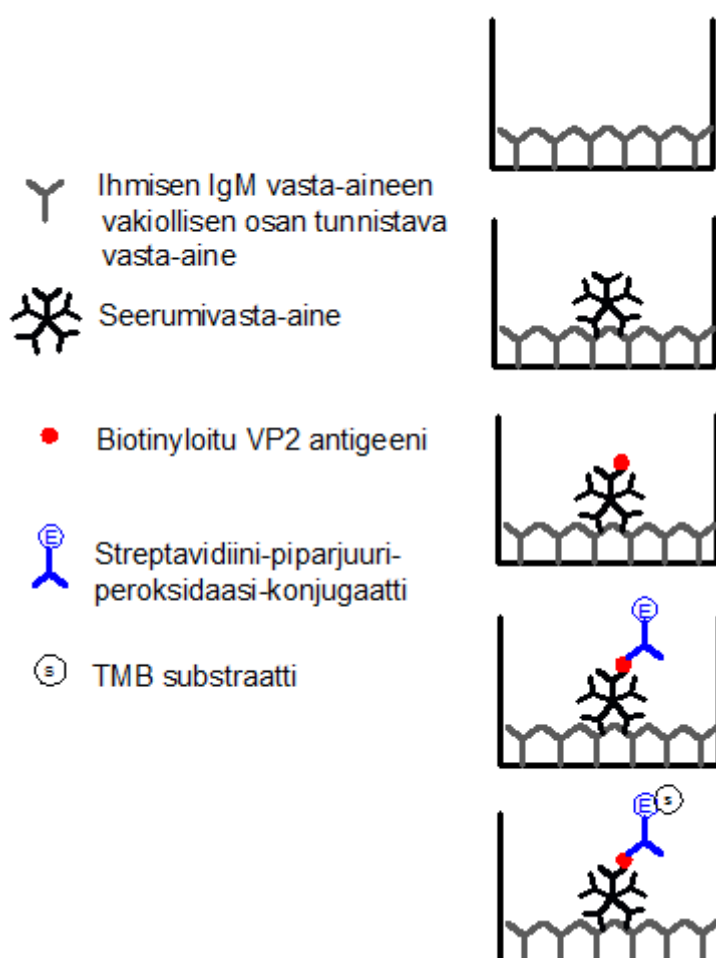
Kuva 3. Kuvassa on esitetty kehitettävän IgG-ELISA-testin toimintaperiaate.

4.3 μ -kaappaus-IgM-ELISA-testi ihmisen parvorokkovirukselle

IgM-testistä voidaan kehitettää μ -kaappaus-ELISA, koska sen on havaittu olevan epä-suoraa ELISA-testiä parempi etsittäessä IgM-vasta-aineita seeruminäytteestä (Hansen ym. 1991; Wreghitt ym. 1985). Epäsuoralla ELISA-testillä IgM-vasta-aineita mitattaessa muun muassa IgG-vasta-aineet ja reumatekijät voivat saada aikaan väärän positiivisen signaalin (Cubie ym. 1993).

B19V- μ -kaappaus-IgM-ELISA:n testikaivot päällystetään ensin ihmisen IgM-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistavalla IgM-vasta-aineella. Seeruminäytteen kaikki IgM-vasta-aineet sitoutuvat kaivon pohjalle kiinnitettyihin vasta-aineisiin. Näytteen jälkeen lisättävä biotinyloitu VP2-rakenneproteiinista koostuva antigeeni tunnistaa ja kiinnittyy ainoastaan B19V-IgM-vasta-aineisiin. Tämän jälkeen lisättävä streptavidini-HRP-

konjugaatti kiinnittyy antigeeniin liitettyyn biotiiniin. Konjugaatin jälkeen kaivoon lisätään TMB-substraatti, joka hajotessaan HRP-entsyymin vaikutuksesta, saa aikaan sinisen värin. Lopuksi reaktio lopetetaan lisäämällä laimeaa happoa, jolloin kuoppaan muodostunut väri muuttuu keltaiseksi. Värin voimakkuus on suoraan verrannollinen seeruminäytteen sisältämän B19V-IgM-vasta-aineen määrään. Kuoppaan muodostuneen värin absorbanssi mitataan spektrofotometrillä aallonpituudella 450 nm. Kehitettävän IgM-ELISA-testin toimintaperiaate on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. Kuvassa on esitetty kehitettävän IgM-ELISA-testin toimintaperiaate.

5 Työn tarkoitus ja tavoitteet

Tämän insinööritoiminnan tarkoituksena oli kehittää Ani Labsystemsille kvalitatiiviset ELISA-testit ihmisen parvorokkoviruksen IgG- ja IgM-vasta-aineiden diagnosoimiseksi potilasnäytteestä. Testit modifioitiin yhteistyölaboratorion vastaavien testien pohjalta sopivaksi suurempiin tuotantomääriin ja kaupallisiin tarkoituksiin. Tavoitteena oli käyttää mahdollisimman paljon Labsystemsillä muissa ELISA-testeissä käytössä olevia reagensseja ja tuotantomenetelmiä. Tärkeimmät työvaiheet on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Kehitettävien testien tärkeimmät työvaiheet.

IgG- ja IgM-ELISA-testit kehitettiin erillisinä projekteina, mutta työvaiheet molempien testien kehityksessä olivat pääpiirteittäin samat. Ensin valittiin sopivat testilevyt ja tehtiin niistä halutunlaiset. Tämän jälkeen valittiin testeissä käytettävät konjugaatit ja eri tarkoituksiin käytettävät laimennos- ja pesupuskurit. Puskurien valinnan jälkeen seulottiin Labsystemsillä seeruminäytevarastoista näytteitä kontrollipaneeliin. Lopuksi muokattiin testien inkubointiajat ja -lämpötilat keskenään yhteneviksi, määritettiin testien raja-arvot ja testattiin rinnan kilpailijoiden testien kanssa.

Tässä insinööriyössä kehitettävät testit eroavat hieman Labsystemsien muista ELISA-testeistä. Työssä käytettiin antigeeninä rekombinanttia biotinyloitua parvorokkoviruksen VP2-rakenneproteiinista koostuvaa viruksen kaltaista partikkelia (VLP), jotka ovat uusia Labsystemsien ELISA-testeissä. Streptavidinin ja biotiinin spesifistä sitoutumista toisiinsa hyödyntäviä ELISA-testejä ei ole Labsystemsillä aikaisemmin käytetty.

6 Materiaalit ja menetelmät

Parvovirus B19 IgG-testissä käytettiin epäsuoraa ELISA-menetelmää (indirect ELISA) ja IgM-testissä μ -kaappaus-ELISA-menetelmää (μ -capture-ELISA).

6.1 Seeruminäytteet

Työtä aloitettaessa käytössä oli akuutin vaiheen positiivisia, negatiivisia ja vanhan immuniteetin seeruminäytteitä (taulukko 1). Näistä seerumeista oli aiempia mittaustuloksia yhteistyölaboratoriosta, joten voitiin olla kohtalaisen varmoja taulukon 1. seeruminäytteiden B19V-IgG- ja IgM-vasta-ainepositiivisuudesta tai -negatiivisuudesta. Osaa näistä samoista seeruminäytteistä käytettiin myös Ani Biotechin parvorokkoviruspika-testin tuotannon laadunvarmistukseen. Molempien testien kehitys aloitettiin näitä seeruminäytteitä käyttämällä. Työn edetessä Labsystemsien omista seerumivarastoista seulottiin näytteitä mahdollisten B19V-vasta-aineiden löytämiseksi. Osaa näistä seeruminäytteistä käytettiin kehitystyötä tehtäessä (taulukko 2).

Taulukko 1. Työssä käytettyjen seeruminäytteiden IgG- ja IgM-vasta-ainepositiivisuus tai -negatiivisuus. - tarkoittaa , että seerumista ei ole saatavilla kyseistä tietoa.

Seeruminäyte	IgM	IgG	Seeruminäyte	IgM	IgG
A 1	Pos.	Neg.	A 51	-	Pos.
A 4	Pos.	Pos.	A 52	Neg.	Pos.
A 5	Pos.	Pos.	A 53	Pos.	Heikko pos.
A 6	Pos.	Neg.	A 55	Neg.	Pos.
A 7	-	Pos.	P1	Neg.	Pos.
A 9	Pos.	Pos.	P2	Neg.	Pos.
A 10	Pos.	Pos.	P3	Neg.	Pos.
A 11	Neg.	Pos.	P4	Neg.	Pos.
A 13	Pos.	Pos.	P5	Neg.	Pos.
A 14	-	Pos.	P6	Neg.	Pos.
A 16	Pos.	Pos.	P7	Neg.	Pos.
A 19	Pos.	Pos.	P8	Neg.	Pos.
A 20	Pos.	Pos.	P9	Neg.	Pos.
A 21	Pos.	Pos.	P11	Neg.	Pos.
A 23	Pos.	Pos.	P12	Neg.	Pos.
A 24	Neg.	Neg.	P13	Neg.	Pos.
A 25	-	Pos.	P14	Neg.	Pos.
A 26	Pos.	Pos.	P15	Neg.	Pos.
A 28	Neg.	Pos.	P16	Neg.	Pos.
A 29	-	Pos.	P17	Neg.	Pos.
A 30	-	Pos.	P18	Neg.	Pos.
A 31	Neg.	Pos.	P19	Neg.	Pos.
A 33	Pos.	Pos.	P20	Neg.	Pos.
A 34	-	Neg.	P21	Neg.	Pos.
A 35	Pos.	Pos.	N2	Neg.	Neg.
A 36	Neg.	Pos.	N4	Neg.	Neg.
A 37	Pos.	Pos.	N5	Neg.	Neg.
A 38	Pos.	Pos.	N6	Neg.	Neg.
A 40	Pos.	Neg.	N7	Neg.	Neg.
A 41	-	Pos.	N8	Neg.	Neg.
A 42	Neg.	Pos.	N11	Neg.	Neg.
A 43	Pos.	Pos.	N13	Neg.	Neg.
A 44	Pos.	Pos.	N15	Neg.	Neg.
A 45	Heikko pos.	Pos.	N16	Neg.	Neg.
A 46	Neg.	Pos.	N17	Neg.	Neg.
A 47	Pos.	Neg.	N18	Neg.	Neg.
A 48	Pos.	Pos.	N20	Neg.	Neg.
A 50	Pos.	Neg.			

Taulukko 2. Työssä käytetyt Labsystems sin omista seerumivarastoista seulotut näytteet ja niiden IgG- ja IgM-vasta-ainepositiivisuus tai –negatiivisuus.

Labsystems seerumit		
Seeruminäyte	IgM	IgG
40N	Neg.	Pos.
H30	Neg.	Pos.
R400	Neg.	Pos.
H464	Neg.	Pos.
P595	Neg.	Pos.
2029	Neg.	Neg.
H478	Neg.	Pos.
H438	Neg.	Raja-arvo
1459	Neg.	Neg.
1457	Neg.	Raja-arvo
600	Neg.	Pos.
5202	Neg.	Pos.
1464	Neg.	Neg.
1571	Neg.	Neg.
1451	Neg.	Neg.
45N	Neg.	Neg.
1492	Neg.	Neg.
1603	Neg.	Neg.
H476	Neg.	Neg.
1559	Neg.	Neg.
T207	Neg.	Pos.
H443	Neg.	Pos.
548	Neg.	Pos.
T159	Neg.	Pos.

Työn aikana Labsystems sin seerumivarastoista seulottiin IgG- ja IgM-testeillä taulukon 2. näytteiden lisäksi yhteensä noin 130 seeruminäytettä.

6.2 B19V-IgG-testin komponenttien optimointi

Ennen varsinaisen kehitystyön aloittamista VP2-rakenneproteiinista koostuvan antigeenin toimivuus testattiin toistamalla testimenettely yhteistyölaboratorion omien ohjeiden mukaisesti. Testi suoritettiin tunnetuilla seeruminäytteillä (taulukko 1). Yhteistyölaboratorion tuloksiin vertaamalla voitiin olla varmoja siitä, että testimenettelyn toisto onnistui. Kaikkonen ym. ovat kuvanneet yhteistyölaboratoriossa käytössä olevan B19V IgG-testin valmistus- ja testausmenetelmän vuonna 1999. (Kaikkonen ym. 1999).

Mikrotitterilevyn valmistus

Antigeeni- tai vasta-ainepäällistetyt mikrotitterilevyn toiminta ja säilyminen ovat erittäin olennainen osa ELISA-testin toimintavarmuutta, joten testin kehittäminen aloitettiin IgG-testin kohdalla antigeenipäällistetyt mikrotitterilevyn valmistamisesta Labsystemsintuotannossa käytössä olevin menetelmin.

Tarkoituksena oli ensimmäisenä muuttaa mikrotitterilevyn antigeenipäällistykseen (coating) inkubointiaika yhdestä tunnista yön yli kestävään inkubointiin. Labsystemsintuotamat streptavidinilevyt ovat samoja, joita käytetään myös yhteistyölaboratorion B19V-IgG-testissä.

Tämän lisäksi testattiin eri antigeenikonsentraatioiden vaikutusta sekä erilaisia taustaa vähentäviä blokkauksliuoksia. Mikrotitterilevyn säilyvyyden parantamiseksi, levyt kuivatettiin vakuumiunissa. Tutkimustulosten perusteella tiedettiin, että vanhan immunitetin B19V:n IgG vasta-aineet tunnistavat vain konformationaalisessa muodossa olevan antigeenin (Söderlund ym. 1995b). Tätä taustaa vasten voitiin testata, kuinka hyvin antigeeni kesti vakuumikuivausta käyttäen tunnettuja B19V:n vanhan immunitetin IgG-vasta-aineita sisältäviä seeruminäytteitä.

Antigeenipäällistykseen jälkeen levyt pestään yleensä erilaisia epäspesifisiä proteiineja, kuten BSA:ta, sisältävällä blokkauksliuoksella. Blokkauksen tarkoituksena on tukkia testikaivosta sellaisia kohtia, joihin jokin testiä häiritsevä proteiini voisi sitoutua. Blokkamalla levyt yritetään siis vähentää mahdollista epäspesifistä tausta signaalia. Erilaisia levyn blokkauksliuoksia testattiin 15 erilaista.

Konjugaatit

Tavoitteena IgG-testin osalta oli siirtyä kaupallisen valmistajan konjugaatista Labsystems itse valmistamaan ihmisen IgG-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistavaan monoklonaaliseen vasta-aineeseen, johon on liitetty piparjuuriperoksidaasientsyymi (IgG-HRP-konjugaatti). Kyseiselle IgG-HRP-konjugaatille oli Labsystemsillä käytössä jo hyväksi havaittu laimennospuskuri, jota päätettiin käyttää myös tässä työssä. Testissä käytetyn konjugaattiliuoksen pitoisuutta säätämällä saatiin mitattavat signaalit haluttuun suuruusluokkaan. Tarkoituksena oli, että IgG-testin raja-arvonäyte antaisi signaalin 0,5 absorbanssiyksikköä.

Laimennospuskurit

Näyte-, kontrolli-, ja pesupuskuriksi testattiin Labsystemsillä jo valmiiksi tuotannossa olevia puskureita, jotka on aiemmin todettu muissa ELISA-testeissä toimiviksi ja hyvin säilyviksi.

Kontrolliseeruminäytteet

Labsystems omista seeruminäytevarastoista seulottiin näytteitä kehitettävällä parvokkivirus IgG-testillä, B19V:n IgG-vasta-aineita sisältävien seeruminäytteiden löytämiseksi. Vasta-aineita ihmisen parvovirus B19:stä vastaan sisältävistä seeruminäytteistä oli tarkoituksena luoda noin 20 näytteen paneeli, joka sisältää positiivisia, negatiivisia sekä raja-arvonäytteitä. Paneelia käytetään tulevaisuudessa Labsystems sisäisessä laadunvarmistuksessa sekä apuna uutta testierää säädettäessä. Seulotuista näytteistä valittiin myös positiivinen ja negatiivinen näyte, joita käytetään testipakkauksen mukaan tulevana kontrollinäytteinä.

Inkubointiajat ja -lämpötilat

Kehitystyötä aloitettaessa sekä yhteistyölaboratoriossa että tärkeimmän kilpailijan parvokkivirus IgG- ja IgM-ELISA-testeissä oli käytössä erimittaiset inkubointiajat eri lämpötiloissa. Asiakkaiden työn helpottamiseksi sekä kilpailuedun saavuttamiseksi tarkoituksena oli kehittää testit niin, että IgG- ja IgM-testien inkubointiajat ja -lämpötilat olisivat yhtenevät. Tällöin molemmat testit voitaisiin tehdä täysin samanaikaisesti sa-

moista näytelaimennoksista. IgG-testissä konjugaatin ja substrattin inkubointilämpötilat muutettiin huoneenlämmöstä vastaamaan IgM-testin +37 °C:een inkubointilämpötilaa. Näytteinkubaatio tapahtui molemmilla testeillä huoneenlämmössä. IgG- testin yhden tunnin näyte- ja konjugaatti-inkubaatiota ja 15 minuutin substraatti-inkubaatiota ei muutettu.

Raja-arvon määrittäminen

IgG-testissä raja-arvotaso määritettiin käyttämällä WHO:n B19V:n IgG-vasta-ainestandardia, jonka B19V-IgG-vasta-ainepitoisuus oli 77 IU/ml. B19V:n IgG-raja-arvona pidetään 3–5 IU/ml (Searle ym. 1997). Tämän testin kehityksessä päätettiin käyttää raja-arvona 5 IU/ml sisältävän näytteen antamaa signaalia. Tuloksia tulkittaessa käytettiin apuna suhdelukua, joka saatiin jakamalla saatu signaali raja-arvonäytteen signaalilla. Negatiivisena pidettiin näytettä, jonka signaali jaettuna raja-arvolla oli pienempi kuin 0,9. Positiivisena pidettiin näytettä, jonka vastaava arvo oli yli 1,1.

Vertailu kilpailijoiden testeihin

Kehitettävää testiä verrattiin rinnan kolmen eri kilpailijan (Biotrin, Euroimmun ja Virion/Serion) vastaavaan tuotteeseen. Näin voitiin varmistua siitä, että tässä insinöörityössä kehitetyt testit toimivat vähintään yhtä hyvin kuin kilpailijoiden testit. Samalla saatiin varmistettua ne seeruminäytteet, joita käytetään jatkossa tuotannon laadunvarmistuksessa.

6.3 B19V-IgM-testin komponenttien optimointi

IgM-testin kehitys aloitettiin kuten IgG-testin kehitys (otsikko 6.2). Yhteistyölaboratoriossa käytössä olevan μ -kaappaus-IgM-ELISA-testin valmistus- ja testausmenetelmä on kuvattu Mira Meriluodon insinöörityössä vuonna 2009 (Meriluoto 2009: 33-35).

Mikrotitterilevy ja antigeeni

IgM-testissä päätettiin käyttää talon sisältä valmiiksi löytyviä, muissa Labsystemsintesteissä käytettäviä, ihmisen IgM-vasta-aineen vakiollisen osan tunnistavalla vasta-aineella päällystettyjä levyjä. Koska IgM-testissä antigeeni lisätään varsinaisen testimenettelyn aikana, täytyy se saada testipakkauksen mukaan hyvin säilyvänä. Tämän vuoksi testattiin antigeenin lyofilisointia. Mahdollista olisi ollut myös laittaa antigeeni testipakkaukseen nestemäisenä konsentraattina, mutta antigeenin lyofilisointi miellettiin paremmaksi vaihtoehdoksi. Koska testin suorittava asiakas ei välttämättä käytä koko testilevyä kerralla, täytyi myös antigeenin säilyvyyttä testata lyofilisoinnin ja uudelleen liuottamisen jälkeen. Säilyvyyttä testattiin säilyttämällä lyofilisoitua ja uudelleen liuotettua antigeeniä pakastimessa.

Konjugaatit

IgM-testiä varten käytettävänä oli kahden eri valmistajan konjugaattia. Toisen valmistajan konjugaatti oli avidiini-HRP-konjugaatti ja toisen streptavidini-HRP-konjugaatti. Näiden kahden eri konjugaatin toimintaa vertailtiin keskenään. IgM-testimenettelyn nopeuttamiseksi kokeiltiin antigeenin ja konjugaatin lisäämistä ja inkuboimista samanaikaisesti. Samanlainen tekniikka oli jo käytössä yhdessä Labsystemsintesteissä, joten päätettiin testata siinä toimivaksi havaittua laimennospuskuria.

Laimennospuskurit

Näyte-, kontrolli- ja pesupuskurit testattiin kuten IgG-testissä (6.2, laimennospuskurit).

Kontrolliseeruminäytteet

Kontrolliseeruminäytteiden seulonta ja käyttö kuten IgG-testissäkin (6.2, kontrolliseeruminäytteet).

Inkubointiajat

IgM-ELISA-testin inkubointiajat muutettiin vastaamaan IgG-testin inkubointiaikoja. Yhteistyölaboratorion IgM-testissä oli käytössä yhden tunnin näyteinkubointi, 45 minuutin erilliset antigeenin ja konjugaatin inkuboinnit sekä 15 minuutin substraatti-inkubointi. Konjugaatin ja antigeenin samanaikainen lisääminen mahdollisti samanmittaiset inkubointiajat kuin IgG-testissä. Tarkoituksena oli, että modifioinnin jälkeen IgM-testin näyteinkubointi kestää yhden tunnin, antigeeni ja konjugaatti yhdessä yhden tunnin ja substraatti 15 minuuttia.

Raja-arvon määrittäminen

B19V:n IgM-vasta-aineelle ei ole olemassa kansainvälistä standardia, joten IgM-testin raja-arvo jouduttiin määrittämään laskennallisesti tunnetuista B19V-IgM-negatiivisista seeruminäytteistä. Raja-arvo laskettiin negatiivisten näytteiden signaalin keskiarvosta johon lisättiin vielä kolme mittaustulosten keskihajontaa. Negatiivisten ja positiivisten näytteiden signaali jaettuna raja-arvolla -suhdeluvun tulkinta suoritettiin samalla tavalla kuin IgG-testissä.

Vertailu kilpailijoiden testeihin

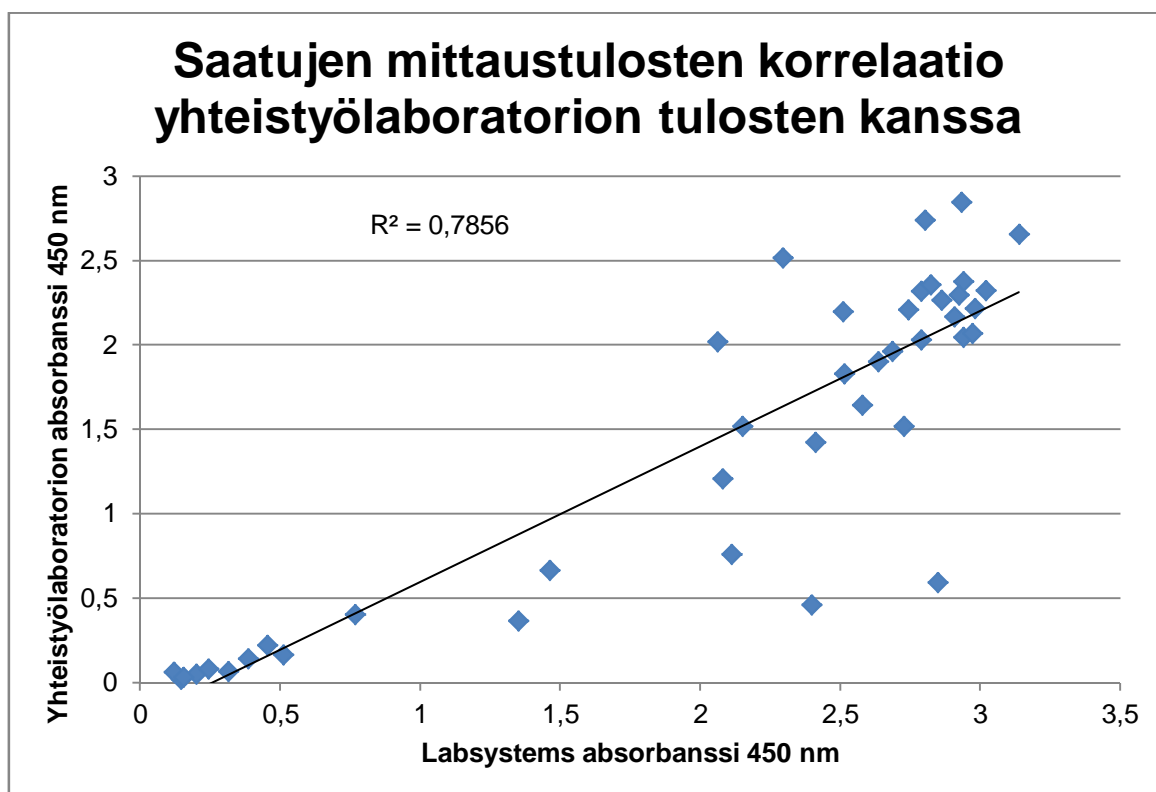
Kehitettävää IgM-testiä verrattiin kilpailijoiden testeihin kuten IgG-testiä (6.2, vertailu kilpailijoiden testeihin). Testatuista kilpailijan B19V-IgM-ELISA-testeistä Biotrinin testi oli tässä työssä kehitettävän testin kaltainen μ -kaappaus-ELISA ja Euroimmunin sekä Virion/Serionin testit epäsuoria ELISA-testejä.

7 Tulokset

7.1 IgG-ELISA-testi

B19V-IgG testin kehitys aloitettiin testaamalla B19V:n VP2-rakenneproteiinista koostuvan antigeenin toimivuutta Labsystemsien laboratoriossa, valmistamalla mikrotitterilevy samalla tavalla kuin yhteistyölaboratoriossa. Tämän jälkeen levy myös testattiin samoilla liuoksilla ja ohjeilla kuin yhteistyölaboratoriossa. Näytteinä käytettiin varmistettuja

B19V-IgG-positiivisia ja -negatiivisia näytteitä (n=41). Saatuja mittaustuloksia verrattiin yhteistyölaboratorion mittaustuloksiin (kuva 6).



Kuva 6. Labsystemsien laboratoriossa tehtyjen mittaustulosten korrelaation yhteistyölaboratoriossa tehtyihin mittauksiin samoista seeruminäytteistä. Kokeessa käytetyt seeruminäytteet ja mittaustulokset liitteessä 1.

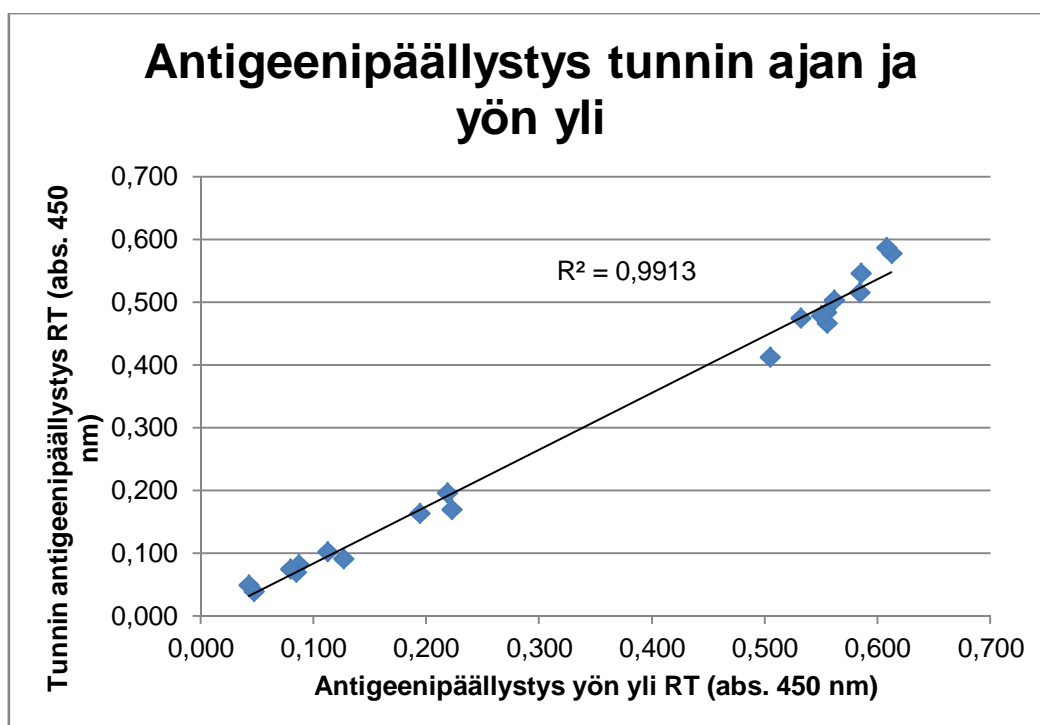
Alustavissa kokeissa todettiin antigeenin toimivan myös Labsystemsien laboratorio-oloissa toistettuna samalla tavalla kuin yhteistyölaboratoriossa (kuvan 6.) Joistain näytteistä saatiin huomattavasti korkeampi signaali kuin yhteistyölaboratoriossa, mutta kaikista testatuista näytteistä saatiin kummallakin testillä sama positiivinen tai negatiivinen tulos (liite 1). Tulosten perusteella aloitettiin B19V IgG-testin muokkaus Labsystemsien tarpeiden mukaiseksi.

7.1.1 Mikrotitterilevy

Mikrotitterilevyn valmistukseen liittyen tutkittiin levyn kuoppien antigeenipäällystyksen onnistumista kahdessa eri lämpötiloissa, sekä päällystykseen käytetyn ajan vaikutusta antigeenipäällystyksen onnistumiseen. Eri lämpötilat olivat huoneenlämpö ja +4 °C.

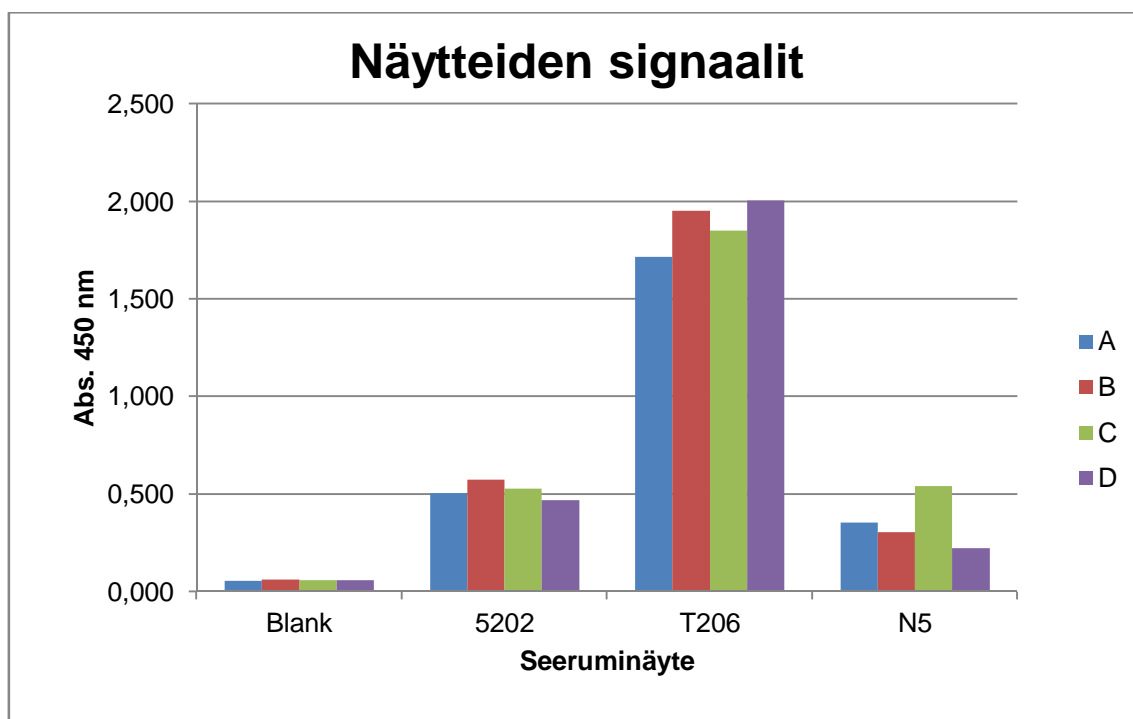
Päällistysten kestonä oli joko yksi tunti tai päällistys yön yli, joka käytännössä vaihteli 16 tunnista 20 tuntiin. Testauksessa käytettiin 20:tä eri seeruminäytettä, jotka pipetoitiin kahteen rinnakkaiseen kaivoon.

Tulosten perusteella valittiin käytettäväksi seuraavissa levyjen päällistyksissä yön yli päällistys huoneen lämmössä (kuva 7), koska kyseinen tekniikka miellettiin kaikista helpoimmaksi toteuttaa tuotanto-olosuhteissa. +4 °C:ssa tehdyn antigeenipäällistysten tulokset eivät juuri eronneet huoneen lämmössä tehdystä päällistyksestä.

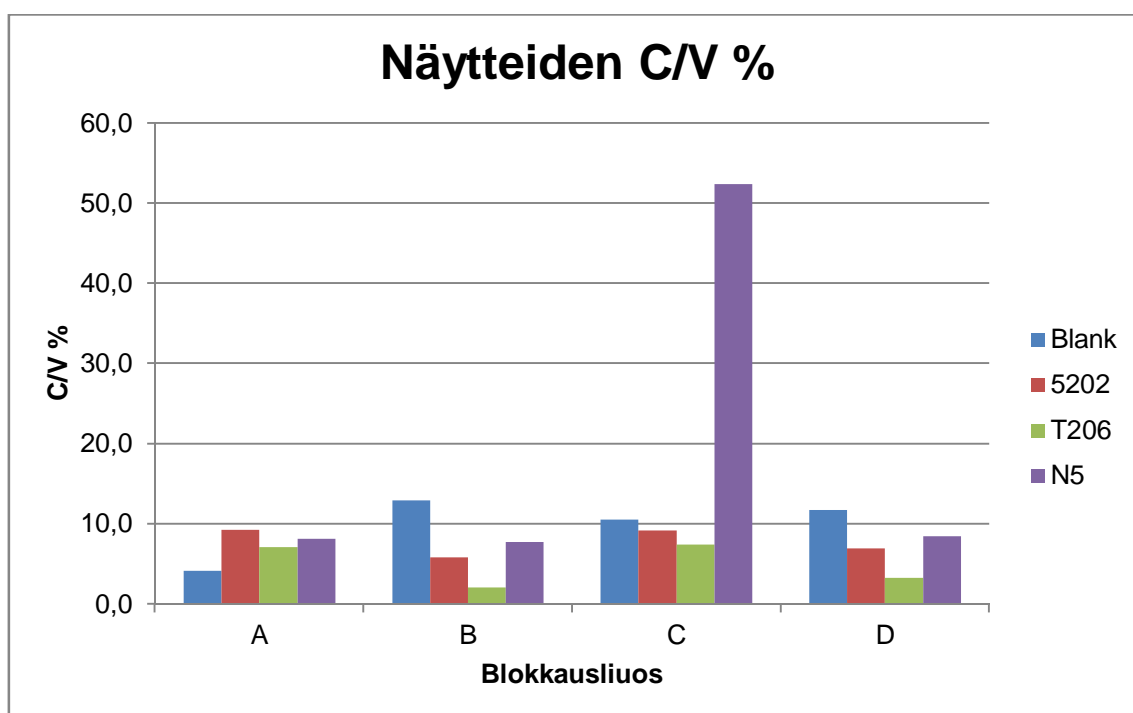


Kuva 7. Yön yli kestävän antigeenipäällistysten korrelaatio tunnin kestävän päällistysten kanssa. Molemmat päällistykset on tehty huoneen lämmössä.

Päällistystavan valitsemisen jälkeen testattiin erilaisia taustaa vähentäviä blokkauksliuoksia, jolla pestään kaivot heti antigeenipäällistysten loputtua. Taustaa vähentävällä blokkauksliuoksella on nimensä mukaisen funktion lisäksi myös suuri vaikutus rinnakkaisten näytteiden välisiin signaalieroihin, joita kuvataan C/V (rinnakkaisten näytteiden keskihajonta / rinnakkaisten näytteiden keskiarvolla) prosentilla (C/V %). Taustaa vähentäviä blokkauksliuoksia testattiin noin 15 erilaista, joista parhaaksi koetuista on esitetty tulokset alla.



Kuva 8. Eri taustaa vähentävien pesuliuosten A, B, C ja D vaikutusta kolmen eri näytteen ja pelkän näytepuskurin signaaleihin. Näytteistä on tehty kuusi rinnakkaista kaivoa.



Kuva 9. Eri taustaa vähentävien pesuliuosten A, B, C ja D vaikutusta kolmen eri näytteen ja pelkän näytepuskurin C/V %:iin. Kaikkien seeruminäytteiden C/V % on laskettu kuudesta rinnakkaisesta näytteestä

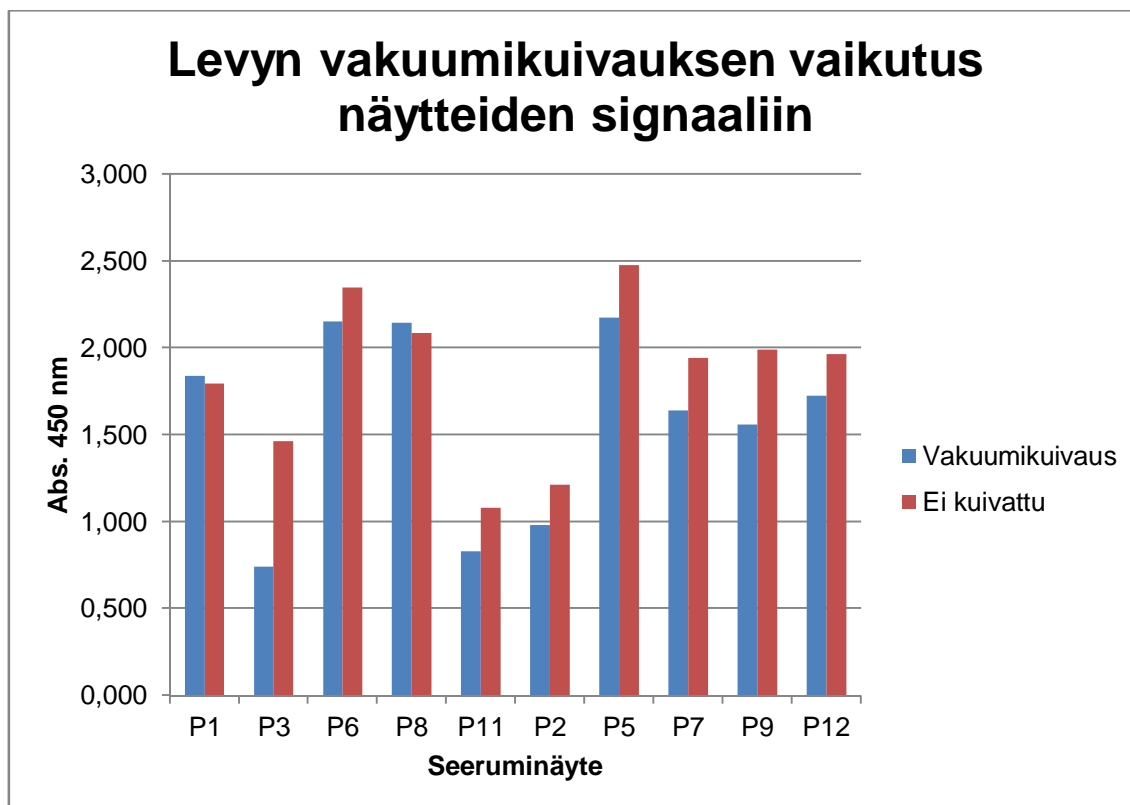
Neljästä eri taustaa vähentävästä blokkausliuoksesta valittiin käytettäväksi vaihtoehto B, koska sillä pestyjen kuoppien seeruminäytteiden C/V % oli kaikista pienin ja sitä oli helpompi valmistaa kuin blokkausliuosta D (kuva 8 ja 9). Myöhemmissä testeissä kävi kuitenkin ilmi, että blokkausliuoksella B valmistettujen levyjen C/V % nousi liian korkeaksi usealla eri seeruminäytteellä. Tämän vuoksi testattiin blokkausliuoksia B ja D rinnakkain yhdellä näytteellä ja suuremmalla rinnakkaisten kaivojen määrällä (n=48). Aiemmista testeistä blokkausliuoksella D oli saatu jo hyviä tuloksia usealla näytteellä C/V %:n osalta.

Tulosten perusteella kävi selkeästi ilmi, että suurella rinnakkaisten kaivojen määrällä testattaessa blokkausliuoksen B C/V % on huomattavasti blokkausliuosta D korkeampi (taulukko 3). Sama testi tehtiin toiseen kertaan samanlaisin tuloksin. Tämän testin ja aiempien testitulosten perusteella siirryttiin käyttämään antigeenipäällistysyksen yhteydessä taustaa vähentävää blokkausliuosta D.

Taulukko 3. Taulukossa on esitetty kahden eri taustaa vähentävän blokkausliuoksen absorbanssi sekä C/V % yhdellä näytteellä. C/V % on laskettu 48 rinnakkaisen kaivon absorbanseista, joiden keskiarvo on esitetty taulukossa.

Taustaa vähentävä blokkausliuos	Näytteen absorbanssi 450 nm (keskiarvo)	Näytteen C/V%
B	0,688	30,07
D	0,951	10,39

Mikrotitterilevyjen säilyvyyden parantamiseksi antigeenipäällistysyksen jälkeen levyt tulee kuivata tehokkaasti. Käytössä olleiden, varmistettujen B19V:n vanhan immuniteetin IgG-vasta-aineita sisältävien seeruminäytteiden avulla voitiin testata antigeenin selvämistä vakuumikuivauksesta.



Kuva 10. Kuvassa on esitetty mikrotitterilevyn antigeenipäälystykseen jälkeisen vakuumikuivauksen vaikutus vanhan immuniteetin seeruminäytteiden absorbanssiin.

Tulosten perusteella todettiin, että vain pieni osa antigeenistä denaturoituu vakuumikuivauksen vaikutuksesta (kuva 10). Tämä näkyi pienenä signaalitason madaltumisena verrattuna kuivaamattomiin levyihin. Signaalitason madaltumisesta huolimatta kaikkien näytteiden signaalit pysyivät selkeästi positiivisen tuloksen puolella.

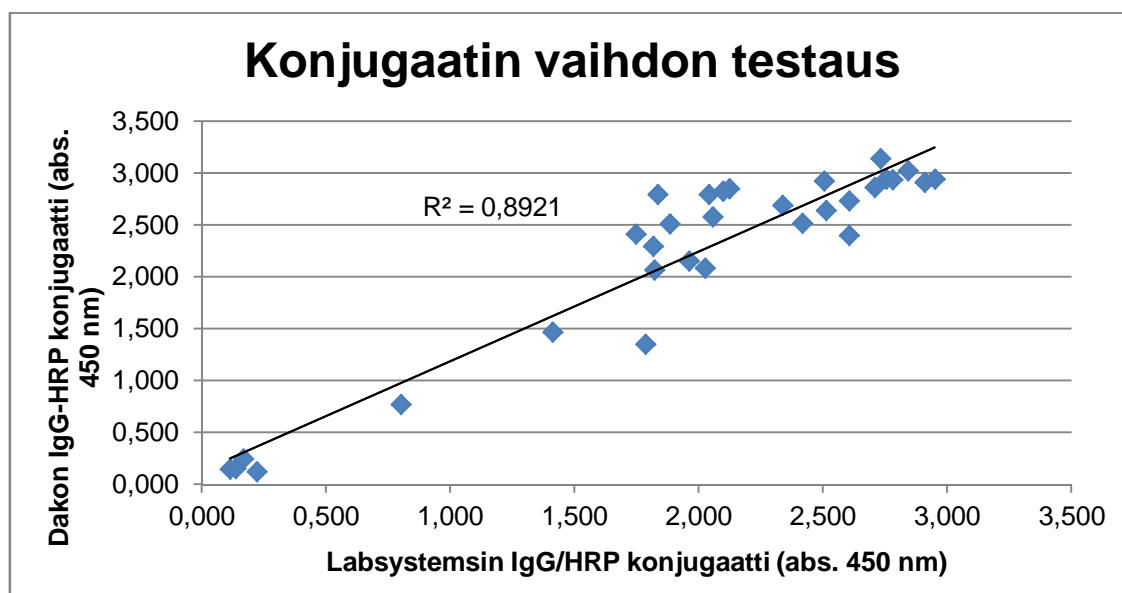
7.1.2 Konjugaatin valinta

Yhteistyölaboratorion käytetään B19V-IgG-testin konjugaattina Dakon valmistamaa IgG-HRP-konjugaattia. Labsystemsillä oli muissa vastaavissa testeissä käytössä oma IgG-HRP-konjugaatti, joten sen soveltuvuutta kehitettävään IgG-ELISA:aan testattiin. Alustavassa testissä Labsystemsien konjugaatti laimennettiin neljään eri vahvuuteen ja verrattiin tuloksia Dakon konjugaatilla saatuihin tuloksiin. Alustava konjugaatin testaus tehtiin yhdellä seeruminäytteellä, josta testattiin neljä rinnakkaista kaivoa konjugaattilamennosta kohden.

Taulukko 4. Tulokset kokeesta, jossa on alustavasti testattu Labsystems'in IgG/HRP konjugaatin soveltuvuutta kehitettävään testiin ja verrattu Dakon valmistamaan konjugaattiin.

Näytteiden absorbanssit		
Dako IgG/HRP	Labsystems IgG/HRP	Labsystems konjugaatin laimennossuhde varastoliuoksesta
0,367	2,046	1:1000
	0,950	1:5000
	0,271	1:25 000
	0,068	1:125 000

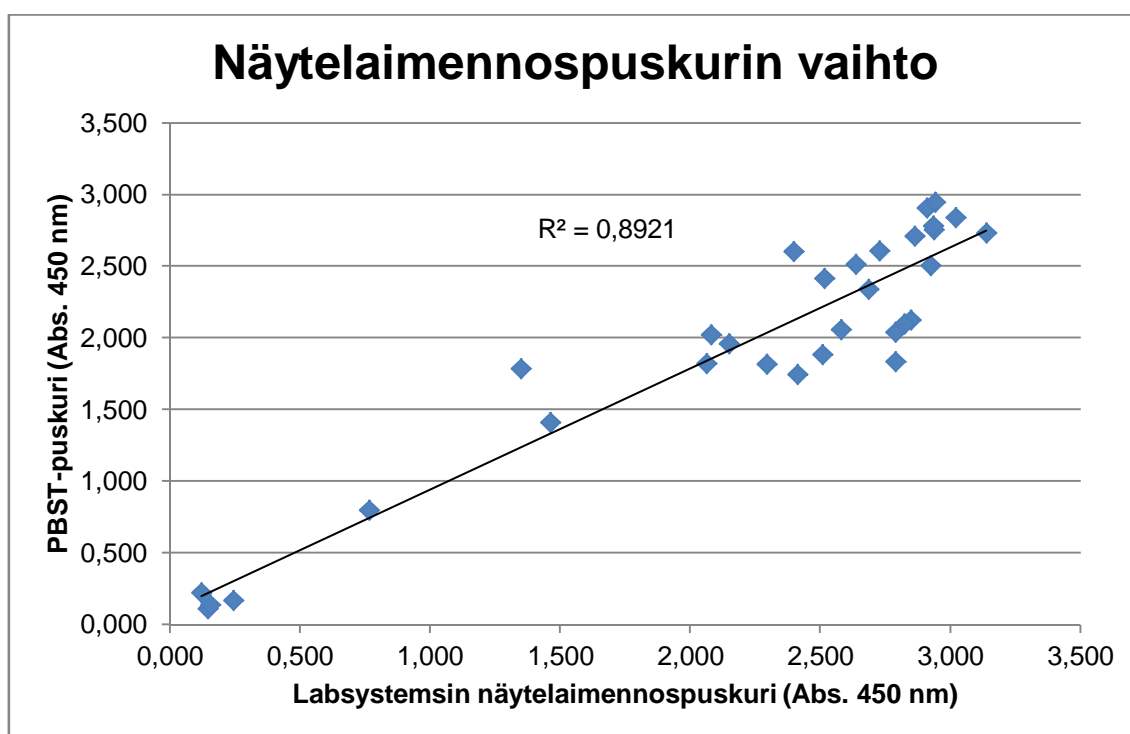
Alustavien tulosten perusteella (taulukko 4) valittiin Labsystems'in konjugaatista tulevia testauksia varten sopiva laimennossuhde varastoliuoksesta. Käytettäväksi valittiin sellainen laimennossuhde, jolla arvioitiin päästävän samaan signaalitasoon kuin aikaisemmin käytössä olleella IgG-HRP-konjugaatilla. Labsystems'in IgG-HRP-konjugaatin toiminnan varmistamiseksi testattiin sitä 31 tunnetulla näytteellä, joista kustakin testattiin kaksi rinnakkaista kaivoa. Tuloksia verrattiin samoista näytteistä Dakon konjugaatilla tehtyihin mittauksiin (kuva11). Tulokset olivat molemmilla konjugaateilla samat kaikista mitatuista näytteistä (liite 2) Mitattujen tulosten perusteella siirryttiin käyttämään Labsystems'in IgG-HRP-konjugaattia.



Kuva 11. Kuvassa on esitetty tulokset Labsystems'in konjugaatista valitun laimennossuhteen 1:15 000 vertaaminen Dakon konjugaattiin samalla näytteellä. Tässä kokeessa käytetyt näytteet ja mitatut signaalit liitteessä 2.

7.1.3 Näyte-, kontrolli- ja pesupuskuri

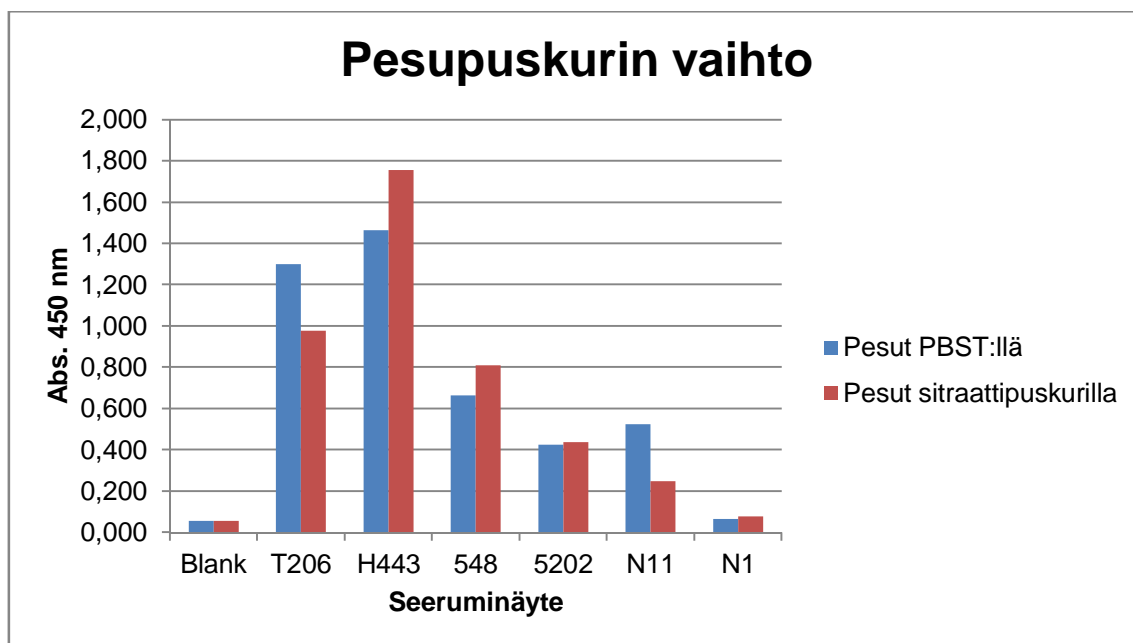
Yhteistyölaboratoriossa käytössä olevassa B19V-ELISA-testissä käytettiin näytteiden laimentamiseen sekä kaivojen pesuihin PBST-puskuria. Kehitettävään testiin haluttiin mahdollisimman paljon Labsystems'in jo käyttämiä puskureita, joten testattiin yhden yleisesti käytetyn näytelaimennospuskurin sekä sitraattipesupuskurin toimivuutta. Tämän lisäksi testattiin puskuria, jota käytetään testipakkausten mukana tulevien positiivisten ja negatiivisten kontrollien laimentamiseen.



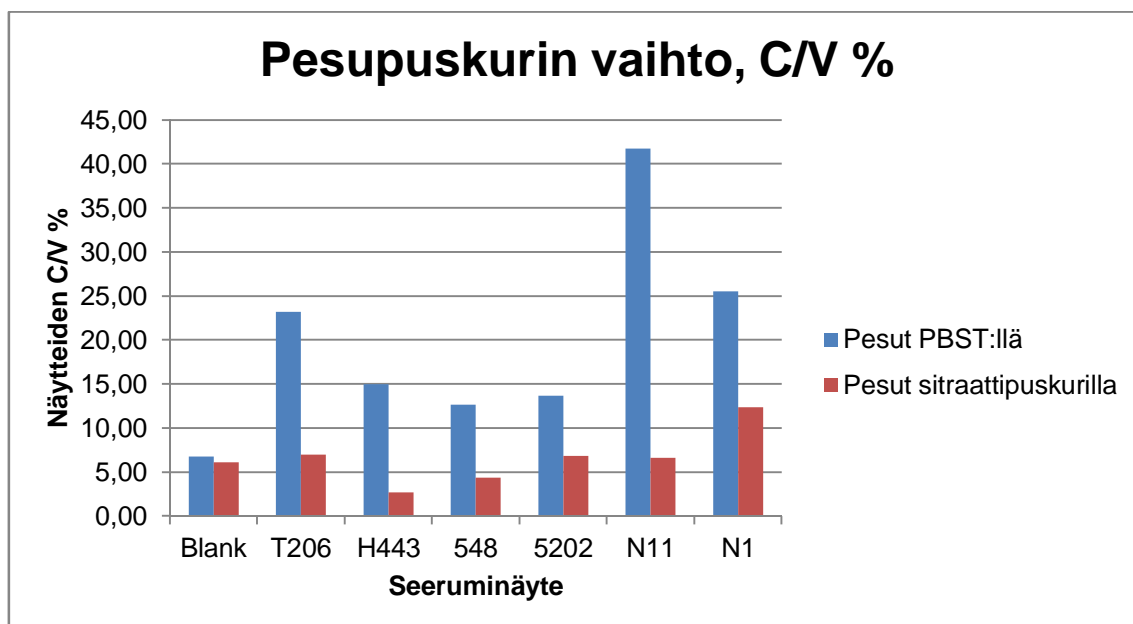
Kuva 12. Labsystems'in näytelaimennospuskurin ja PBST-puskuriin laimennettujen seeruminäytteiden tulosten korrelaatio samoilla näytteillä.

Labsystems'in näytelaimennospuskuria ja PBST-puskuria vertailtaessa käytettiin 31 eri näytettä, joista jokaisesta testattiin kaksi rinnakkaista kaivoa. Tulosten perusteella todettiin Labsystems'in oman näytelaimennospuskurin ja PBST-puskurin tulosten korreloivan keskenään erittäin hyvin (kuva 12). Myös muissa kokeissa, joissa vertailtiin näitä kahta näytelaimennosliuosta, saatiin samanlaisia tuloksia. Tämän ja aiempien kokeiden tulosten perusteella vaihdettiin näytelaimennospuskuri Labsystems'in omaan puskuriin.

Sitraattipesupuskurin toiminta testattiin kolmella positiivisella ja kolmella negatiivisella näytteellä. Sitraattipesupuskurilla saatuja tuloksia verrattiin PBST-puskurilla saatuihin tuloksiin.



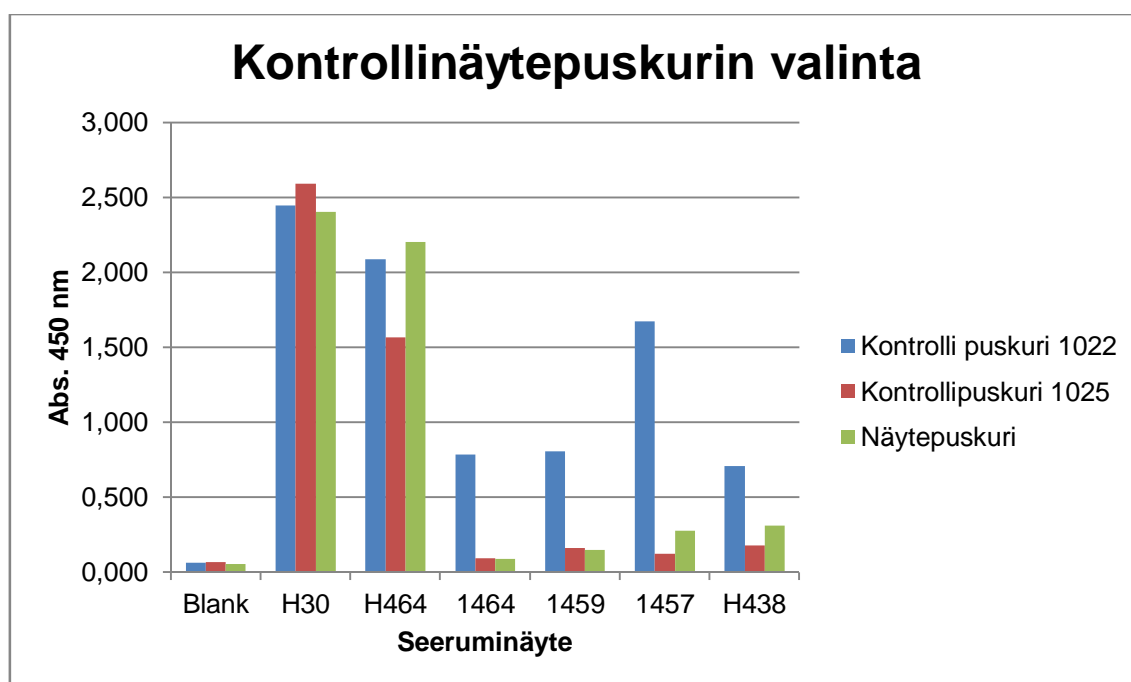
Kuva 13. Tulokset kokeesta, jossa toisen levyn pesut suoritettiin PBST-puskurilla ja toisen levyn pesut Labsystems-sitraattipesupuskurilla.



Kuva 14. Rinnakkaisten kaivojen (n=3) C/V %-t kokeesta, jossa vertailtiin PBST-puskuria ja sitraattipesupuskurin toimivuutta keskenään.

Tulosten perusteella todettiin, että sitraattipesupuskurin käyttö parantaa testikuoppien välistä C/V %:a huomattavasti (kuva 14). Sitraattipesupuskurin käytöllä ei ollut merkittävää eroa, kun verrattiin sen näytteistä saatavia signaaleja PBST-pesun signaaleihin (kuva 13.). Näyte N11 näyttäisi tosin olevan selkeämmin negatiivinen, sitraattipesupuskurilla, kuin PBST-puskurilla. Samankaltaisiin tuloksiin päästiin myös, kun verrattiin tunnettujen näytteiden paneelin sitraattipesupuskurin tuloksia PBST-pesun tuloksiin samoista näytteistä. Tulosten perusteella siirryttiin tulevaisuudessa käyttämään sitraattipesupuskuria.

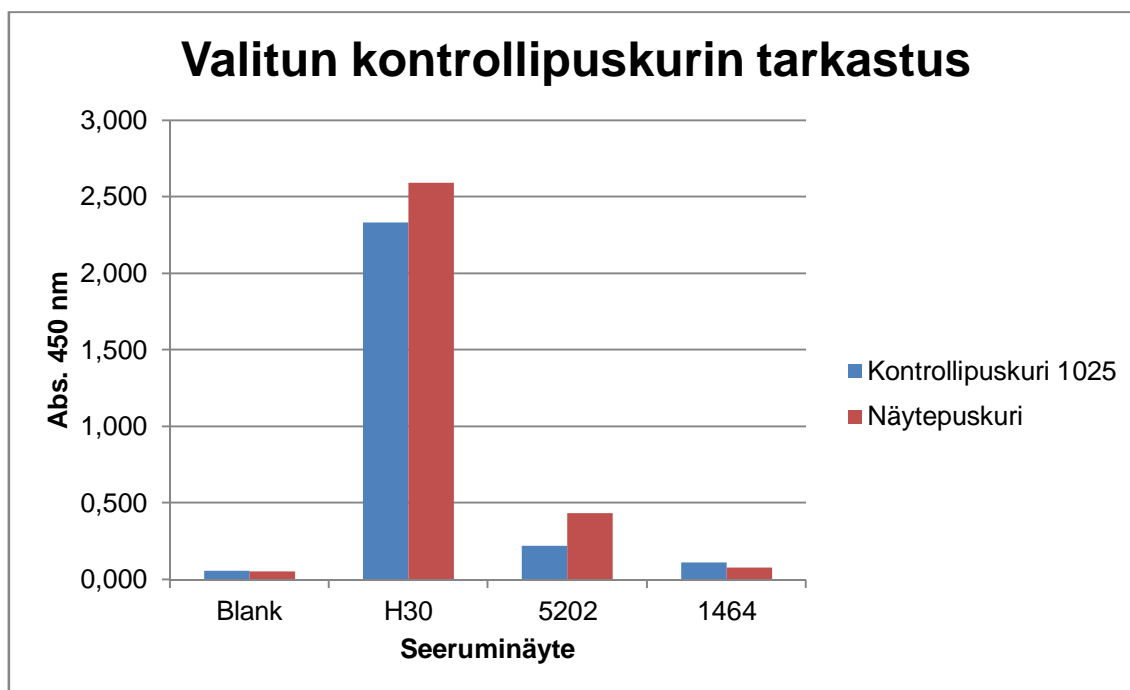
Kontrolliseeruminäytteiden laimennospuskuriksi testattiin kahta erilaista puskuria. Kontrollinäytepuskureiden toimintaa testattiin kahdella positiivisella ja neljällä negatiivisella seeruminäytteellä. Kontrollinäytepuskuriin laimennettujen näytteiden tuloksia verrattiin näytelaimennospuskuriin laimennettujen näytteiden tuloksiin.



Kuva 15. Tulokset testistä, jossa verrattiin kahden eri kontrollipuskurin toimivuutta ja verrattiin tuloksia näytelaimennospuskurista saatuihin tuloksiin. Näytteet testattiin kahdessa rinnakkaisessa kaivossa.

Kahdesta testatusta kontrollipuskurista käytettäväksi valittiin tulosten perusteella kontrollipuskuri 1025 (kuva 15). Kontrollipuskurilla 1025 saatiin samansuuntaisia tuloksia kuin näytepuskurilla. Kontrollipuskurilla 1022 saatiin negatiivisista näytteistä liian suuria tuloksia, joten se päätettiin hylätä. Kontrollipuskurin 1025:n toimivuus testattiin vielä

kolmella eri kontrollinäytteeksi ajatellulla näytteellä ja verrattiin tuloksia näytepuskurista saatuihin tuloksiin (kuva 14). Kontrollipuskurilla tehdyistä kokeista huomattiin kontrollipuskurin laskevan hieman näytteistä saatavaa signaalia. Tämä täytyi ottaa huomioon, kun etsittiin sopivia näytteitä testien kontrolleiksi.



Kuva 16. Tulokset valitun kontrollipuskurin toimivuuden testauksesta mahdollisilla kontrollinäytteillä.

7.1.4 Kontrolliseeruminäytteet

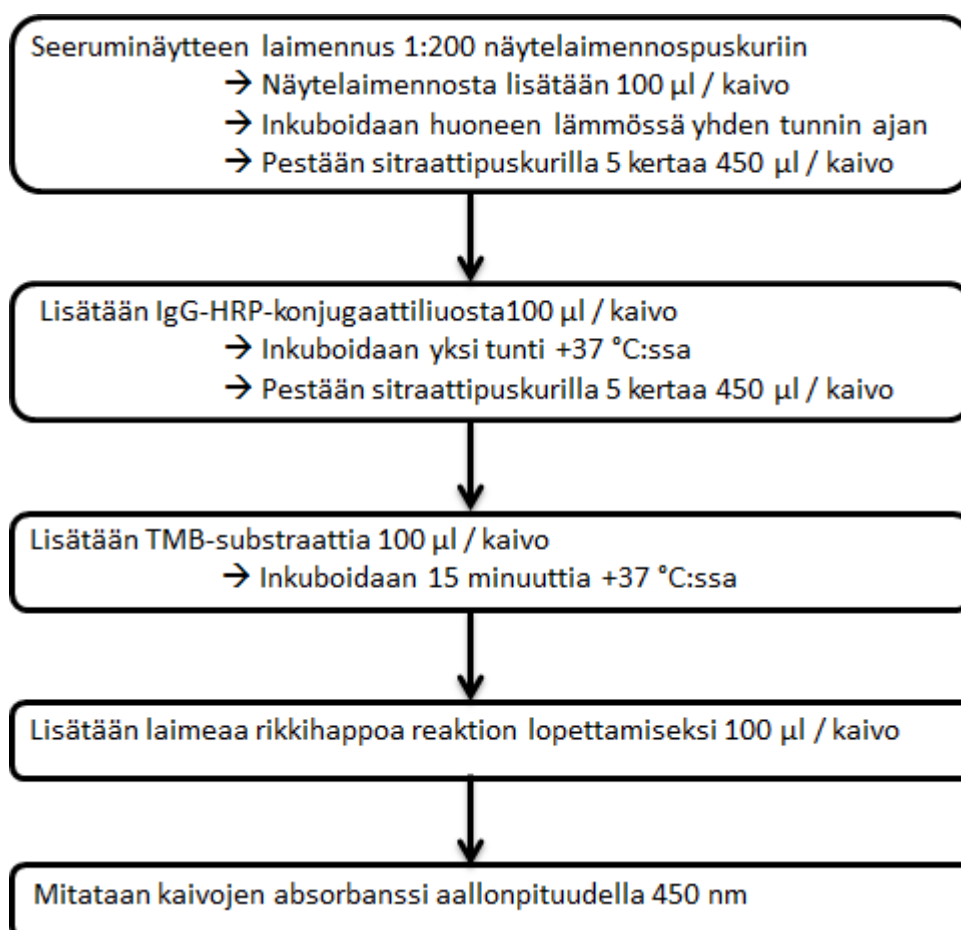
Testipakkausten mukana oleva positiivinen ja negatiivinen kontrolli valittiin Labsystemsin omista seerumivarastoista työn aikana saatujen tulosten perusteella. Positiiviseksi kontrolliksi valittiin seeruminäyte H30 ja negatiiviseksi näyte numero 1559. Näistä näytteistä oli saatu koko työn ajan tasaisia tuloksia. Kumpaakin näytettä oli myös varastossa niin paljon, että oltiin varmoja niiden riittävydestä useaksi vuodeksi.

Kaikista Labsystemsin seerumivarastoista testatuista noin 150 näytteestä noin 80 % oli B19V-IgG-positiivisia, alle viisi raja-arvosignaalin antavia ja loput negatiivisia. Testattujen näytteiden seropositiivisuus on samaa luokkaa kuin B19V-IgG-positiivisuus vanhus-ten keskuudessa. Tosin positiivisten näytteiden määrä on todennäköisesti hieman to-

dellista matalampi, koska joitakin varaston seeruminäytteistä on aikojen saatossa sekoitettu keskenään. Raja-arvosignaaleja saatiin testatuista näytteistä vain hyvin vähän.

7.1.5 Inkubaatioajat ja -lämpötilat

IgG-testissä tarkoituksena oli muuttaa IgG-HRP-konjugaatin ja substraatin inkubaatiolämpötila huoneen lämmöstä +37 °C:seen, kuten IgM-testissä. IgG-testin osalta inkubaatioaikoihin ei tehty muutoksia yhteistyölaboratorion testiin verrattuna. Tulosten perusteella muutettiin konjugaatin ja substraatin inkubaatiolämpötilat huoneen lämmöstä +37 °C:seen (kuva 19. ja taulukko 6.). Tehtyjen toimenpiteiden jälkeen IgG-testin näyteinkubaatio kesti yhden tunnin huoneen lämmössä, konjugaatin inkubaation yhden tunnin +37 °C:ssa ja substraatin inkubaatio 15 minuuttia +37 °C:ssa (kuva 17).



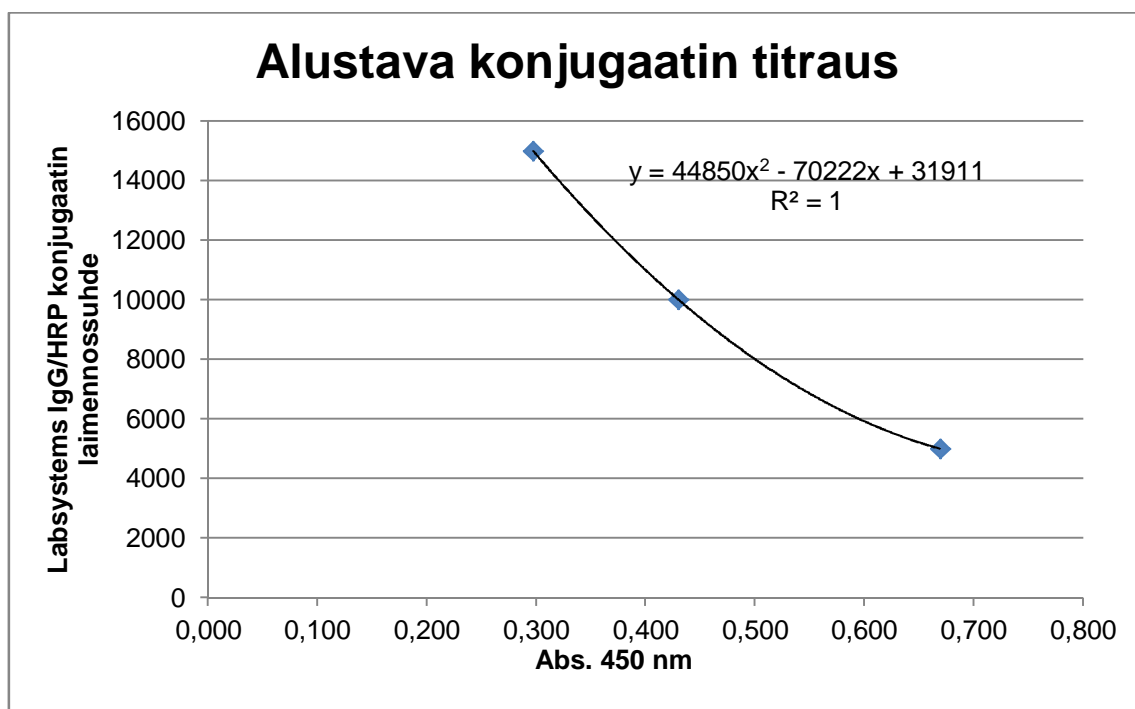
Kuva 17. Kehitetyn B19V-IgG-ELISA-testin lopullinen testimenettely

7.1.6 Konjugaatin säätö ja raja-arvo

IgG-testille määritettiin raja-arvo WHO:n B19V:n IgG-standardia käyttämällä. Standardista valmistettiin 1:2 laimennossarja 77 IU/ml:sta 1,2 IU/ml:aan asti (laimennossarjan näytteiden n=7). Kun verrattiin taulukon 5 tuloksia laadunvarmistuspaneeliin valittujen seeruminäytteiden (taulukko 2) absorbansseihin, todettiin, että yhden näytteen absorbanssi oli täsmälleen sama kuin IU arvon 4,8. Koska IU arvoa 5 pidettiin positiivisen ja negatiivisen raja-arvona, voitiin seeruminäytettä H438 käyttää hyväksi konjugaatin alustavassa säädössä. Reagenssien säästämiseksi, tehtiin konjugaatin suurpiirteinen säätö ensin yhdellä näytteellä (kuva 18) ja sitten testattiin sen toimivuutta useammalla näytteellä (kuva 19).

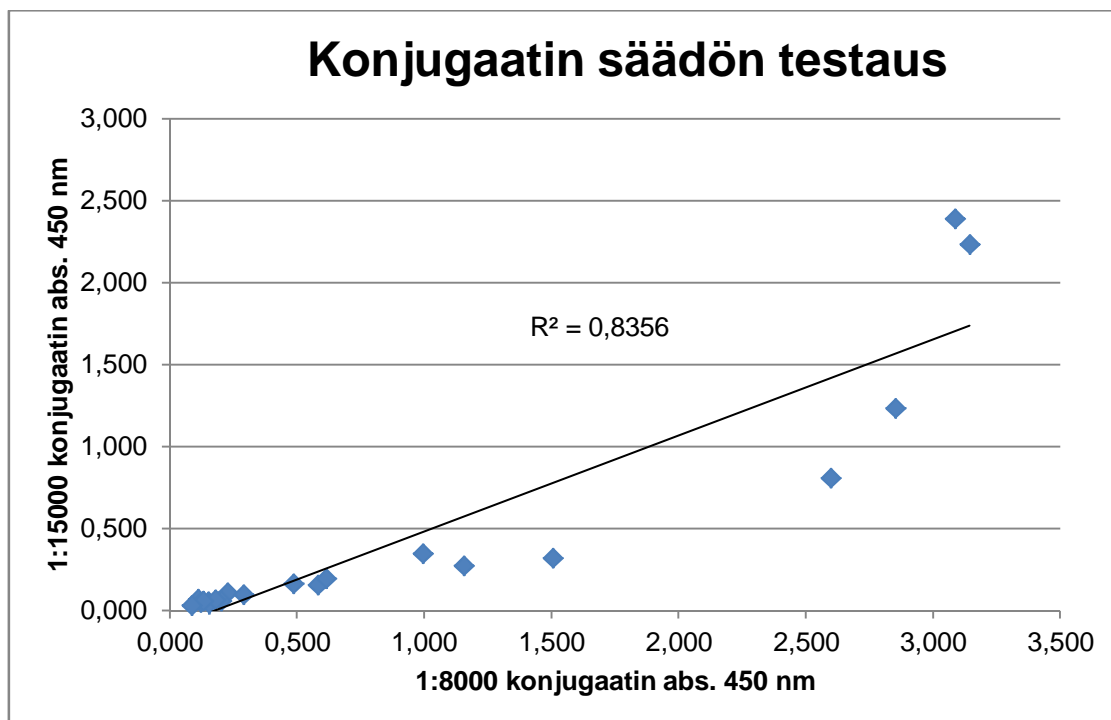
Taulukko 5. Tulokset WHO:n standardista tehdystä 1:2-laimennossarjasta, sekä samalla mitatun seeruminäytteen H438 tulos. Näytteet on mitattu kahdella rinnakkaisella kaivolla.

WHO standardi (IU)	Absorbanssi
77	1,189
38,5	0,962
19,3	0,793
9,6	0,323
4,8	0,209
2,4	0,104
1,2	0,073
Seeruminäyte	Absorbanssi
H438	0,209



Kuva 18. Labsystemsigin IgG/HRP konjugaatin laimennossuhteen vaikutus absorbanssiin yhdellä seeruminäytteellä H438 (neljä rinnakkaista kaivoa per laimennos).

Kun kuvan 18 standardisuoran yhtälöstä ratkaistaan y , x :n ollessa haluttu raja-arvo 0,5 absorbanssiyksikköä (mittauksessa käytetyllä seeruminäytteellä H438), saadaan tulokseksi 8012,5. Labsystemsigin B19V-IgG-testin vertailussa kilpailijoiden vastaaviin testeihin käytettiin IgG/HRP-konjugaatille laimennossuhdetta 1:8000 varastoliuoksesta. Konjugaatin säätö tarkistettiin useammalla seeruminäytteellä ($n=20$) ja verrattiin tuloksia aiemmin käytettyyn konjugaattipitoisuuteen (kuva 19).



Kuva 19. Tulokset konjugaatin säädön testauksesta. Y-akselin tulokset ovat testiajosta, jossa konjugaatti- ja substraatti-inkubaatio ovat tehty huoneen lämmössä. X-akselin tulokset ovat testiajosta jossa konjugaatti- ja substraatti-inkubaatio on tehty +37 °C:ssa. Käytetyt seeruminäytteet ja mittausten signaalit liitteessä 3.

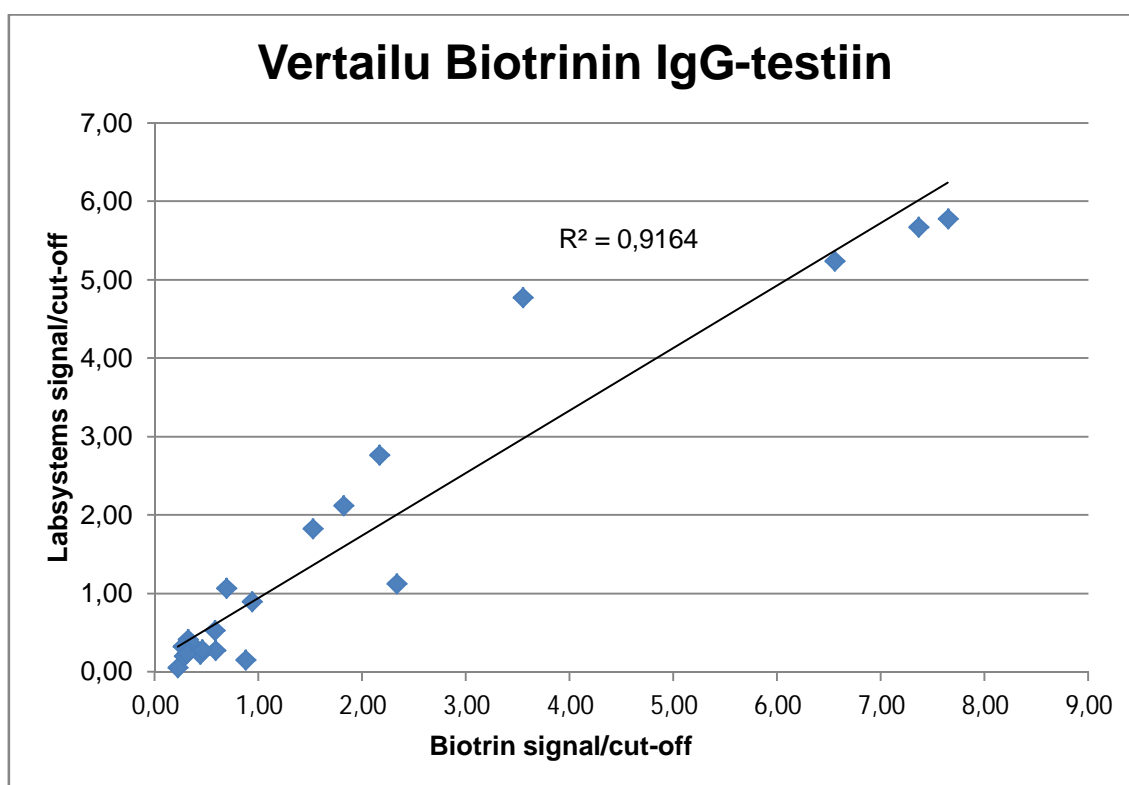
Suuremmalla konjugaattipitoisuudella, signaalitason noususta huolimatta, näytteistä saadut tulokset olivat samat kuin pienemmällä konjugaattipitoisuudella (kuva 19.; taulukko 6.; liite 3). Selkeästi positiivisilla näytteillä havaittiin signaali jaettuna raja-arvolla - suhdeluvussa selkeä pudotus. Tästä huolimatta kyseiset näytteet olivat luokiteltavissa selkeästi positiivisiksi.

Taulukko 6. Tulokset konjugaatin säädön testauksesta. 1:15 000 osion testiajossa konjugaa- tin ja substraatin inkubaatiot on tehty huoneen lämmössä ja 1:8000 osion vas- taavat ajot on tehty +37 °C:ssa.

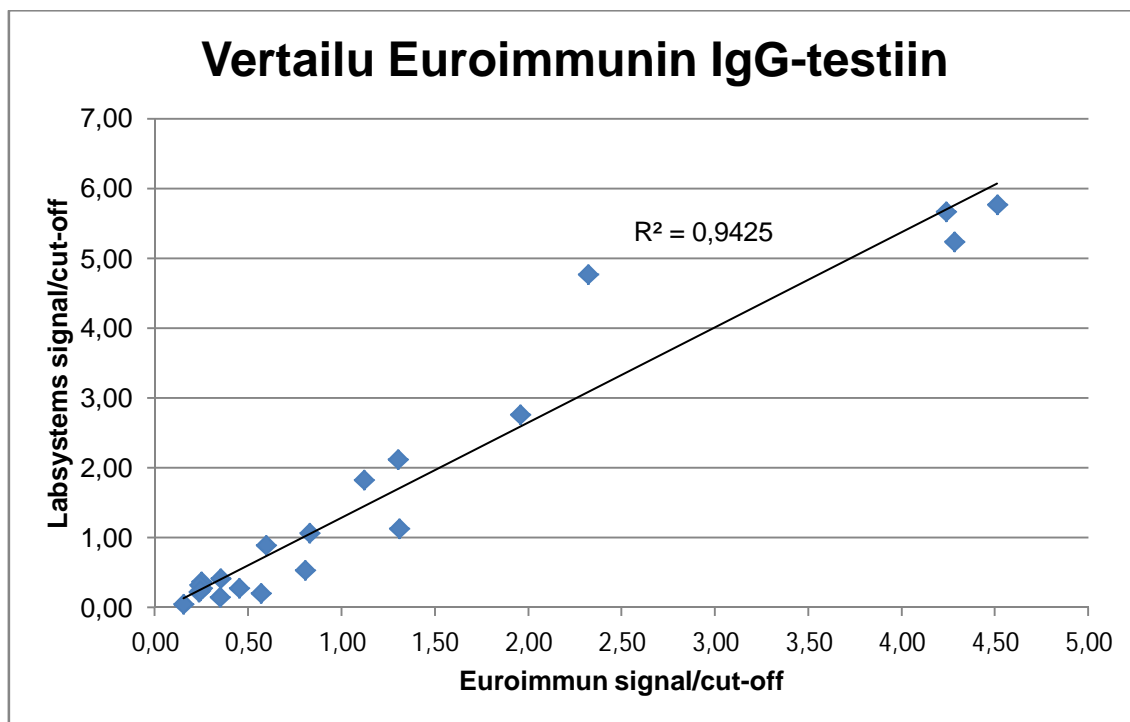
n = 20		1:15000		
		Positiivinen	Raja-arvo	Negatiivinen
1:8000	Positiivinen	8	0	0
	Raja-arvo	0	2	0
	Negatiivinen	0	0	10

7.1.7 Vertailu kilpailijan testiin

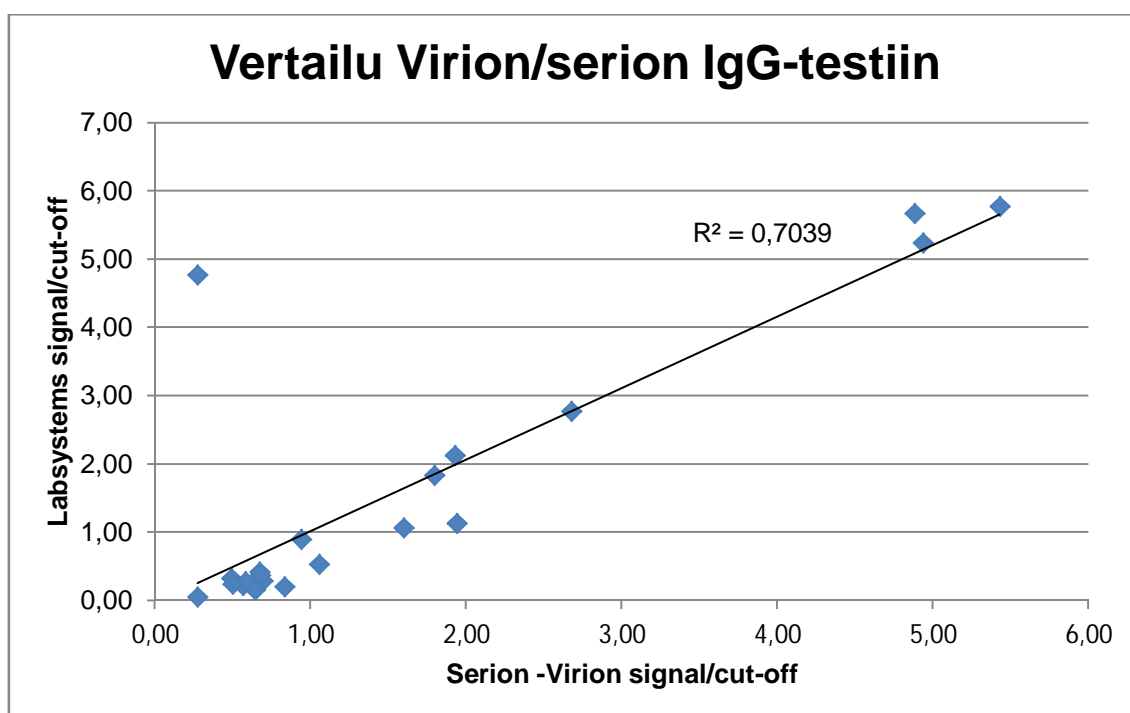
Kehitettyä B19V-IgG-testiä verrattiin kolmen eri kilpailijan vastaavaan ELISA-testiin. Labsystemsille kehitetyn ELISA-testin tulosten korrelaatiot kilpailijan testeihin on esitetty kuvissa 20–22. Taulukoissa 7–9 on esitetty tässä insinööriyössä kehitetyn IgG-testin positiivisten-, negatiivisten- ja raja-arvonäytteiden samankaltaisuutta kilpailijoiden testeihin. Kilpailijoiden testeihin verrattaessa käytetyt seeruminäytteet ja signaali jaettuna raja-arvolla -suhdeluvut on esitetty liitteessä 4.



Kuva 20. Labsystemsille kehitetyn B19V IgG ELISA-testin vertailu Biotrinin vastaavaan ELISA-testiin samoilla seeruminäytteillä.



Kuva 21. Labsystemsille kehitettyä B19V IgG ELISA-testin vertailu Euroimmunin vastaavaan ELISA-testiin samoilla seeruminäytteillä.



Kuva 22. Labsystemsille kehitettyä B19V IgG ELISA-testin vertailu Virion/Serionin vastaavaan ELISA-testiin samoilla seeruminäytteillä.

Taulukko 7. Kehitetyn (Labsystems) testin samankaltaisuus Biotrinin vastaavaan testin kanssa.

n = 20		Biotrin		
		Positiivinen	Raja-arvo	Negatiivinen
Labsystems	Positiivinen	8	0	0
	Raja-arvo	0	1	1
	Negatiivinen	0	0	10

Taulukko 8. Kehitetyn (Labsystems) testin samankaltaisuus Euroimmunin vastaavaan testin kanssa.

n = 20		Euroimmun		
		Positiivinen	Raja-arvo	Negatiivinen
Labsystems	Positiivinen	8	0	0
	Raja-arvo	0	1	1
	Negatiivinen	0	0	10

Taulukko 9. Kehitetyn (Labsystems) testin samankaltaisuus Virion/Serionin vastaavaan testin kanssa.

n = 20		Virion/Serion		
		Positiivinen	Raja-arvo	Negatiivinen
Labsystems	Positiivinen	7	0	1
	Raja-arvo	1	1	0
	Negatiivinen	1	4	5

Labsystems testin korrelaatiot Biotrin testitulosten (kuva 20; taulukko 7) ja Euroimmunin testitulosten (kuva 21; taulukko 8) kanssa olivat erittäin hyvät. Labsystems testitulokset erosivat Biotrinin ja Euroimmunin tuloksista yhden näytteen osalta, joista kummassakin tapauksessa näyte oli sama (seeruminäyte H438). Biotrinin ja Euroimmunin testeillä tämä näyte oli negatiivinen ja Labsystems testillä raja-arvonnäyte, joten suuresta erosta ei ollut kyse. Seeruminäyte H438 on antanut Labsystems testillä toistuvasti raja-arvosignaalin. Näiden tulosten perusteella, raja-arvot mukaan lukien,

Labsystemsille kehitetyn IgG-testin samankaltaisuus Biotrinin ja Euroimmunin IgG-testien kanssa oli 95 %.

Labsystemsien testin ja Virion/Serionin testin tulokset eivät korreloineet keskenään läheskään niin hyvin kuin Biotrinin ja Euroimmunin testitulosten kanssa (kuva 22). Virion/Serionin testillä saatiin huomattavan paljon raja-arvotuloksia, jonka vuoksi tulokset erosivat Labsystemsien testin tuloksista merkittävästi (taulukko 9). Kahden näytteen tulokset erosivat jopa kokonaan toisistaan. Yksi seeruminäytteistä oli Labsystemsien testillä negatiivinen ja Virion/Serionin testillä positiivinen ja toinen Labsystemsien testillä voimakkaasti positiivinen, mutta Virion/Serionin testillä negatiivinen (taulukko 9). Virion/Serionin muista testeistä poikkeavat tulokset kertovat sen huonommasta erottelukyvystä verrattuna muihin tässä työssä testattuihin B19V-IgG-ELISA-testeihin. Virion/Serionin heikohko positiivisten ja negatiivisten näytteiden erottelukyky voi johtua esimerkiksi siitä, että sen testilevyn valmistuksessa on puutteita.

7.2 IgM-ELISA-testi

B19V-IgM-testin kehityksessä käytettiin samoja seeruminäytteitä kuin IgG-testin kehityksessä. IgM-testin kehitys aloitettiin vertailemalla kahden eri konjugaatin toimivuutta ja jatkettiin eteenpäin vaihe kerrallaan.

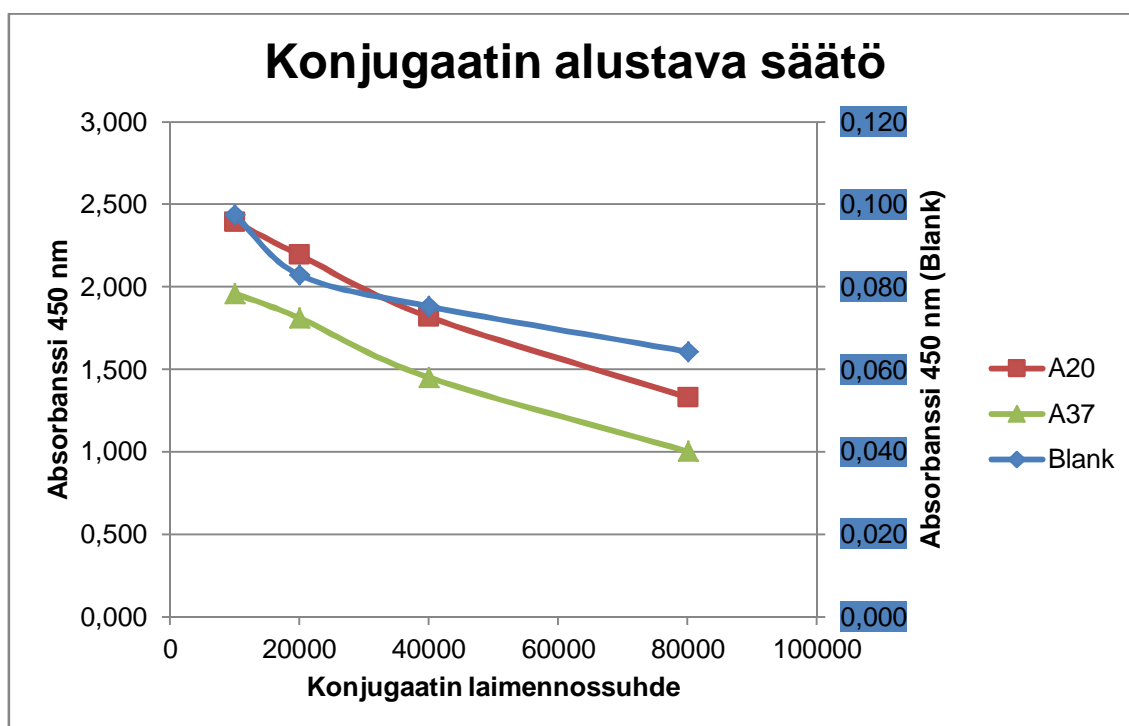
7.2.1 Konjugaatin valinta

Testattavina oli kahden eri valmistajan HRP-konjugaatit, joista toinen oli streptavidini-HRP-konjugaatti ja toinen avidiini-HRP-konjugaatti. Konjugaatit laimennettiin alustavissa testauksissa yhteistyölaboratorion ohjeiden mukaisesti.

Taulukko 10. Signaali ja C/V % pelkällä näytelaimennosliuoksella käyttäen kahta erilaista konjugaattia.

Konjugaatti	Absorbanssi	C/V %
Streptavidini-HRP	0,355	13,02
Avidiini-HRP	0,217	6,93

Alustavien tulosten perusteella valittiin käytettäväksi aidiini-HRP-konjugaatti. Ensimmäisten tulosten perusteella testatulla streptavidiini-HRP-konjugaatilla pelkällä näytelaimennosliuoksella saatu signaali oli todella korkea (taulukko 10) Myös seeruminäytteistä saadut signaalit streptavidiini-konjugaatilla olivat huomattavan korkeita, jonka vuoksi testin erottelukyky näytti huonolta. Valitun aidiini-HRP-konjugaatin pitoisuus säädettiin alustavasti, siten että pelkän laimennosliuoksen signaali oli tarpeeksi matala ja positiivisten näytteiden signaalit tarpeeksi suuret.



Kuva 23. Aidiini/HRP konjugaatin laimennuksen vaikutus näytteistä saatavaan signaaliin. Näytteiden A20 ja A37 signaalit on esitetty vasemman puoleisella y-akselilla ja pelkän laimennosliuoksen signaali, siniseksi merkatulla, oikeanpuoleisella y-akselilla.

Tulosten perusteella valittiin konjugaatille sellainen laimennossuhde, jolla pelkän näytelaimennosliuoksen signaali oli tarpeeksi matala ja kahden positiivisen seeruminäytteen signaalit pysyivät selkeästi positiivisina (kuva 23). Valittu konjugaatin laimennossuhde testattiin vielä käyttämällä 23 seeruminäytettä, joista 11:stä oli mittaustuloksia yhteistyölaboratorion IgM-testistä.

Aidiini-konjugaatilla saadut signaalit olivat jonkin verran yhteistyölaboratorion signaaleja korkeampia. Mitattujen näytteiden tulokset olivat kuitenkin, yhtä näytettä (A9) lukuun ottamatta, samanlaisia yhteistyölaboratorion mittaustulosten kanssa (taulukko

11). Yhteistyölaboratorio piti näytettä positiivisena, kun siitä saatu signaali oli yli 0,22 absorbanssiyksikköä. Labsystems testille ei vielä tässä vaiheessa ollut määritetty tarkkaa raja-arvoa, mutta sen arvioitiin olevan noin 0,5 absorbanssiyksikköä.

Yhtä lukuun ottamatta kaikista ennakkotietojen mukaan positiivisista näytteistä saatiin positiivinen signaali. Näytteestä A9 saatiin kehitettävällä testillä negatiivinen signaali vaikka se oli yhteistyölaboratorion testillä ollut vahvasti positiivinen. Myös kahdesta negatiivisesta näytteestä saatiin negatiivinen signaali kehitettävällä testillä. Tulosten perusteella tulevissa testeissä päätettiin käyttää aidiini-konjugaatin varastoliuksesta samaa laimennossuhdetta kuin tässä kokeessa. (Taulukko 11).

Taulukko 11. Aidiini-HRP-konjugaatin alustavan säädön testaus 23 seeruminäytteellä, joista jokaisesta on mitattu rinnakkaiset kaivot.

Seeruminäyte	Labsystems signaali (450 nm)	Yhteistyölaboratorion tulos
A1	1,240	
A4	1,461	1,114
A5	1,344	0,913
A9	0,300	1,146
A10	0,732	0,471
A11	0,357	Negatiivinen
A13	1,300	-
A16	0,749	0,405
A19	1,239	0,85
A20	1,399	-
A21	0,996	-
A23	1,257	1,37
A26	1,399	-
A38	0,959	-
A40	1,228	1,342
A43	1,140	1,284
A44	1,199	0,931
A45	0,807	0,287
A47	1,098	-
A48	0,919	-
A50	1,321	-
A52	0,407	-
A53	1,382	-

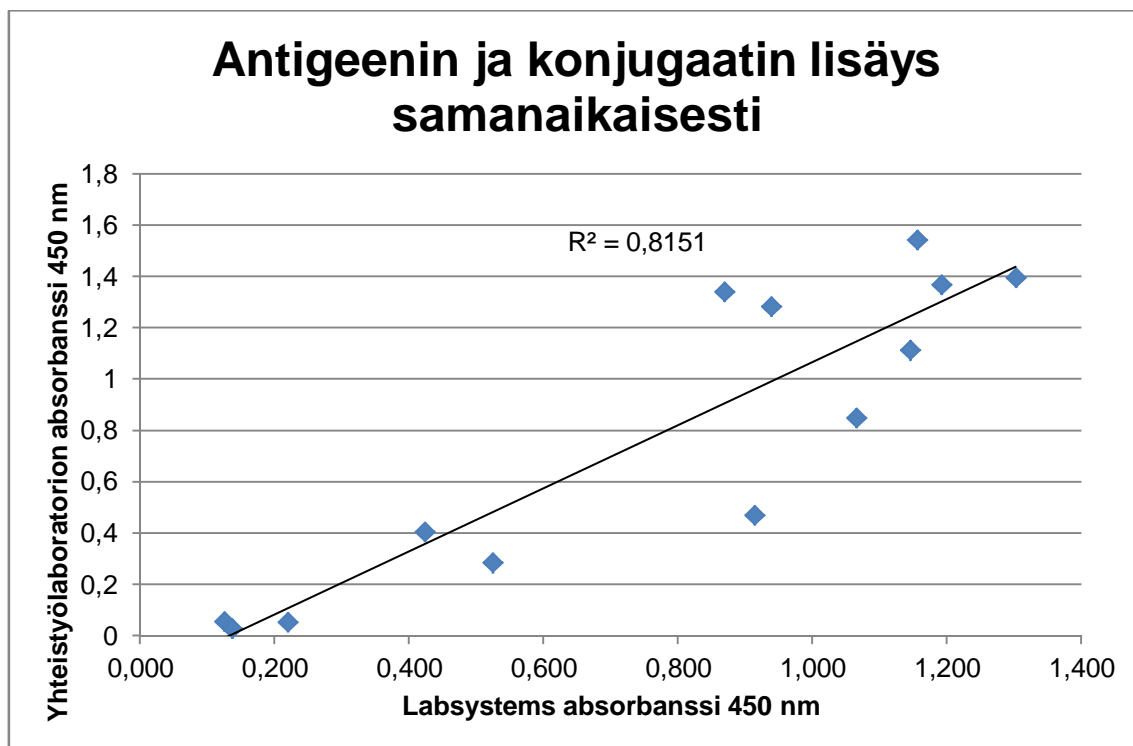
Kehitystyön myöhemmässä vaiheessa selvisi, että valitulla aidiini-HRP-konjugaatilla saatiin muutamalla Labsystems seerumivaraston näytteellä väärä positiivisia tulok-

sia. Asiaa on selvitetty tarkemmin osiossa: Vertailu kilpailijoiden testeihin ja väärät positiiviset tulokset. Vaikka muutamalla seulotuista näytteistä saatiin väärää positiivisia tuloksia, pidettiin aikaisemmissa testeissä saatuja tuloksia luotettavina, koska niissä oli käytetty tunnettuja näytteitä, joista oli mittaustuloksia myös yhteistyölaboratorion B19V-IgM-ELISA-testistä.

7.2.2 Antigeenin ja konjugaatin lisäys samaan aikaan sekä inkubointiajat

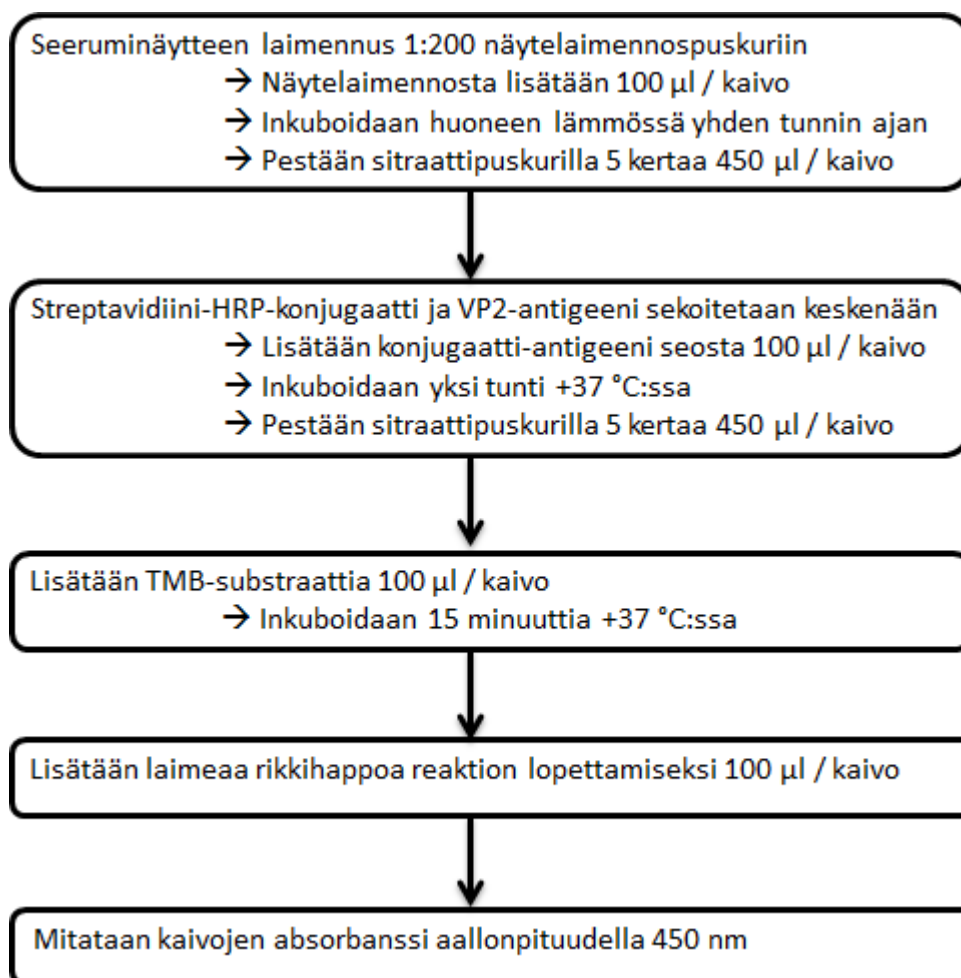
Kilpailuedun saavuttamiseksi testattiin antigeenin ja konjugaatin samanaikaista lisäämistä testikaivoihin. Konjugaatin ja antigeenin samanaikainen lisäys mahdollisti myös IgM-testin inkubointiaikojen yhdenmukaistamisen IgG-testin kanssa. Antigeenin ja konjugaatin samanaikaista lisäämistä testattiin ensin kolmella positiivisella ja kolmella negatiivisella näytteellä. Eri näytteillä verrattiin myös kolmen erilaisen laimennospuskrin toimivuutta. Kun alustavista kokeista oli saatu hyviä tuloksia ja parhaaksi todettu laimennospuskuri valittu, testattiin antigeenin ja konjugaatin samanaikainen lisäys 13:sta seeruminäytteellä, joista kolme oli negatiivisia ja kymmenen positiivisia.

Testatuista näytteistä kaikki kolme negatiivista näytettä antoivat negatiivisen signaalin. Kymmenestä positiivisesta näytteestä yhdeksän antoi kehitettävällä testillä positiivisen signaalin ja yksi raja-arvosignaalin. (liite 5). Testin tulosten perusteella todettiin, että antigeenin ja konjugaatin samanaikainen lisääminen toimii yhtä hyvin kuin niiden erilliset lisäykset ja erilliset inkubaatiot (kuva 24). Tulosten perusteella seuraavissa kokeissa päätettiin käyttää antigeenin ja konjugaatin samanaikaista lisäämistä ja inkuboimista.



Kuva 24. Tulokset testistä, jossa antigeeni ja avidiini-HRP-konjugaatti on lisätty testikaivoihin samaan aikaan. Jokaisesta näytteestä testattiin kaksi rinnakkaista kaivoa.

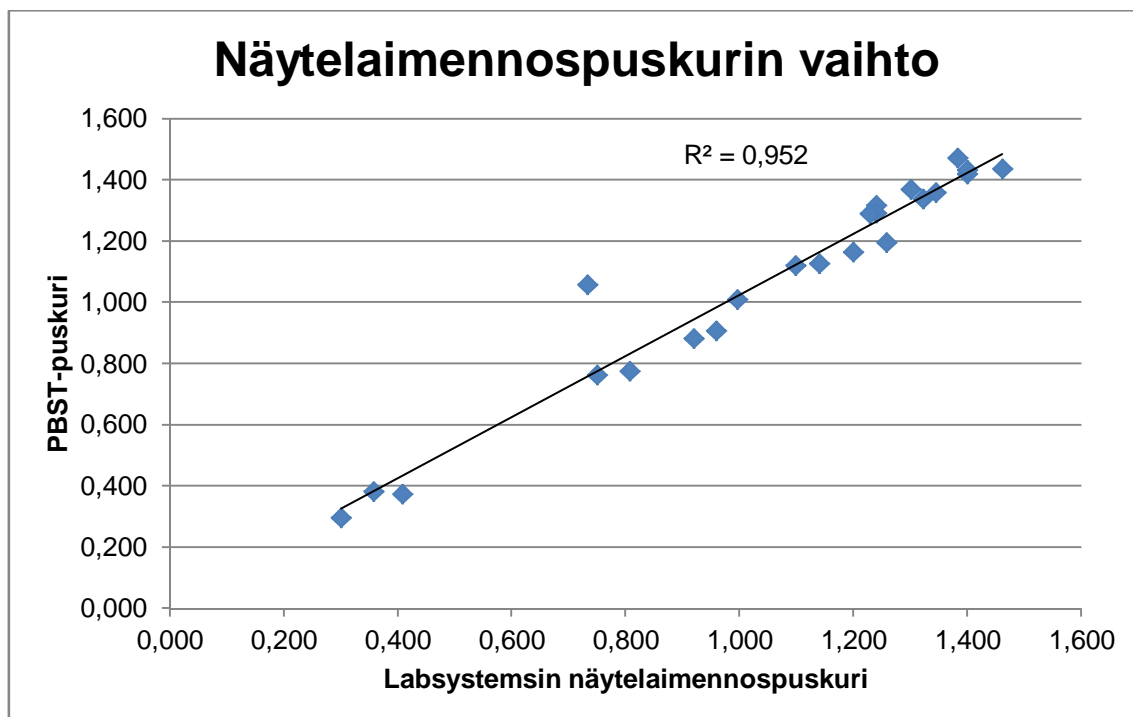
Tämän muutoksen jälkeen IgM-testin ja IgG-testin testimenetelmien inkubointiajat ja -lämpötilat olivat yhdenmukaiset. Seeruminäytteitä inkuboitiin yksi tunti huoneen lämmössä, antigeeni-konjugaatti-yhdistelmää yksi tunti +37 °C:ssa ja substraattia 15 minuuttia +37 °C:ssa (kuva 25).



Kuva 25. Kehitetyn B19V-IgM-ELISA-testin lopullinen testimenettely

7.2.3 Näytelaimennospuskuri ja pesupuskuri

Labsystemsinn näytelaimennospuskuria testattiin rinnakkain, tähän asti käytetyn, PBST-puskurin kanssa 23 seeruminäytteellä. Näytelaimennospuskuriin laimennetuista näytteistä saadut signaalit korreloivat erittäin hyvin PBST-puskurilla saatujen tulosten kanssa (kuva 26). Tulosten perusteella siirryttiin käyttämään Labsystemsinn omaa näytelaimennospuskuria.

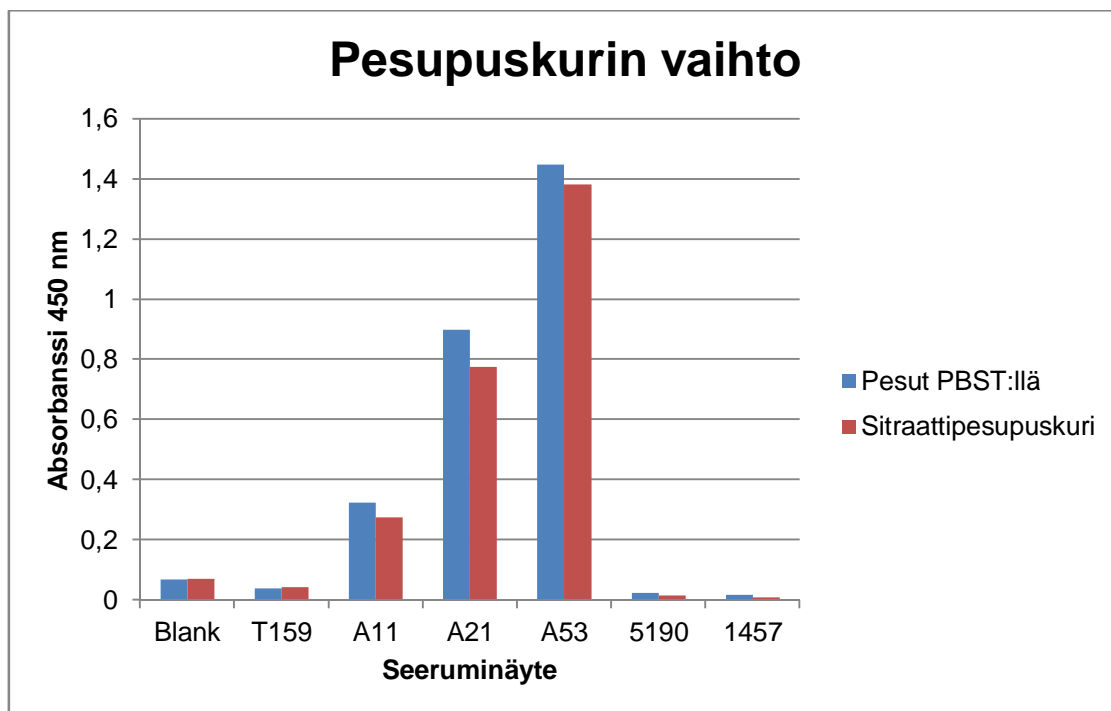


Kuva 26. Labsystemsinnäytelaimennospuskurin ja PBST:hen laimennettujen näytteiden korrelaatio. Kaikista näytteistä testattiin kaksi rinnakkaista kaivoa.

Tähän asti inkubaatioiden väliset kaivojen pesut oli tehty PBST-puskurilla. Labsystemsinnäytelaimennospuskurin toimintaa testattiin ja tuloksia verrattiin PBST-puskurilla pestyjen kaivojen tuloksiin. Testaus tehtiin neljällä negatiivisella ja kahdella positiivisella näytteellä. Tulosten perusteella siirryttiin käyttämään sitraattipesupuskuria (kuva 27 ja taulukko 12). Näytteiden 5190 ja 1457 suuret C/V %-t selittyvät hyvin pienellä signaalilla (kuva 27) ja C/V %:ja tutkittaessa kiinnitettiin eniten huomiota signaalia antavien näytteiden C/V %:ihin.

Taulukko 12. Kuvassa 25. esitettyjen tulosten C/V %-t kahdella eri pesupuskurilla. Kaikki näytteet on testattu kahdessa rinnakkaisessa testikaivossa.

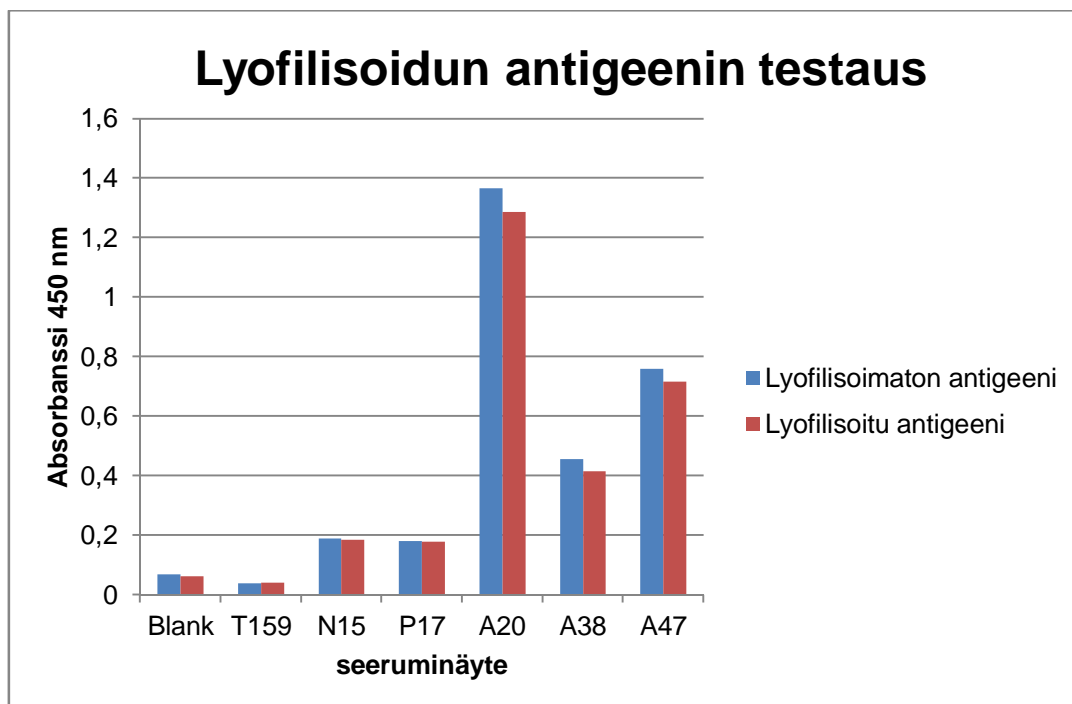
Pesupuskuri	Seeruminäyte						
	Blank	T159	A11	A21	A53	5190	1457
Pesut PBST-puskurilla, C/V %	3,09	16,53	0,22	3,62	5,17	9,03	12,86
Sitraattipesupuskuri, C/V %	6,42	4,99	3,35	4,93	4,81	43,89	96,76



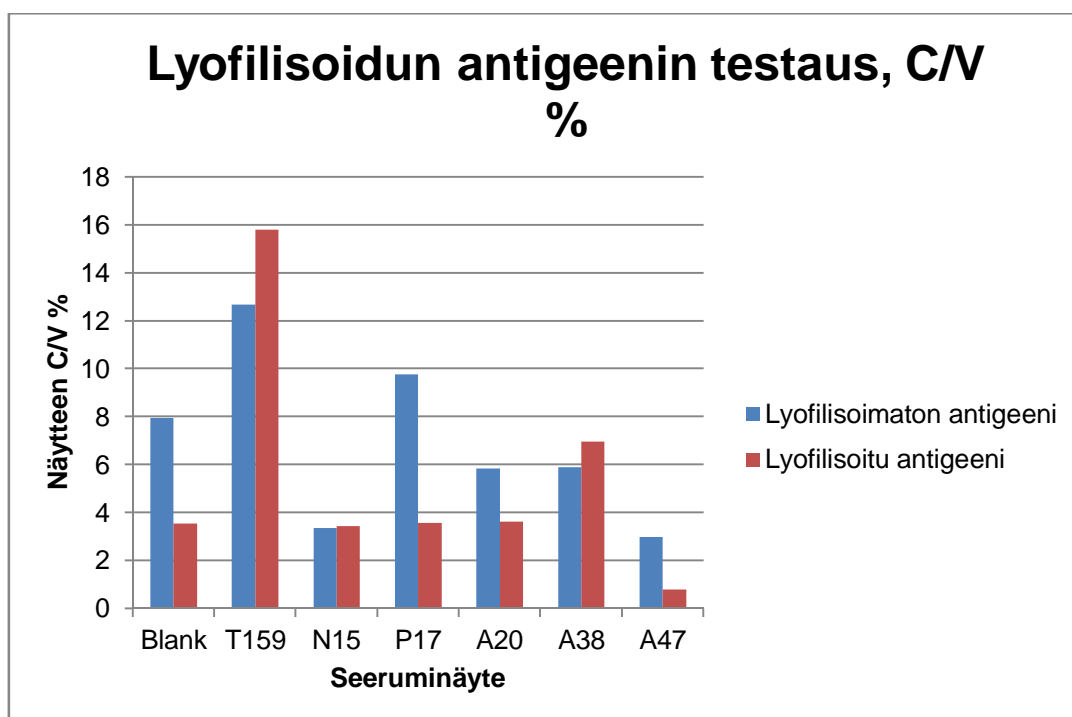
Kuva 27. Tulokset kokeesta, jossa verrattiin keskenään sitraattipesupuskurin ja PBST-pesujen eroa näytteistä saatavaan absorbanssiin.

7.2.4 Antigeenin lyofilisointi

Antigeenit lyofilisoitiin yön yli Labsystems'in lyofilisaattorilla käyttäen Labsystems'in omaa lyofilisointipuskuria. Lyofilisoinnin vaikutus antigeenin toimintaan testattiin kolmella B19V-IgM-negatiivisella ja kolmella IgM-positiivisella seeruminäytteellä. Kokeen tulokset on esitetty kuvissa 28 ja 29.



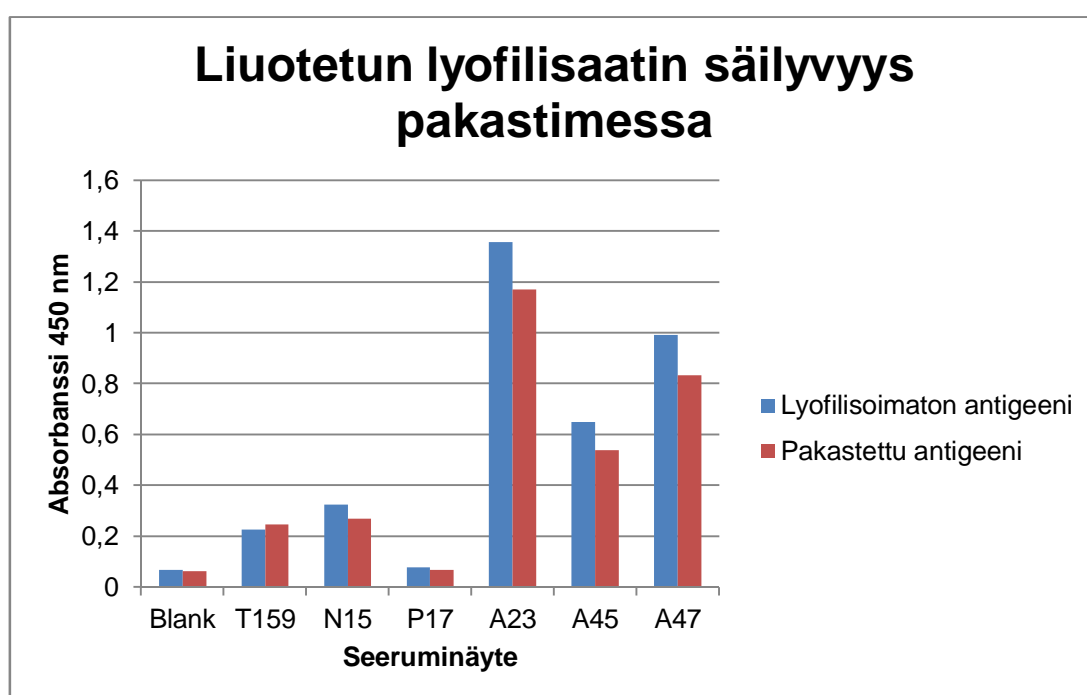
Kuva 28. Ensimmäiset tulokset antigeenin lyofilisoinnin vaikutuksesta seeruminäytteistä saataviin signaaleihin. Jokaisella näytteellä on testattu kahdella rinnakkaisella kaivolla.



Kuva 29. Rinnakkaisten kaivojen C/V %:t kokeesta, jossa vertailtiin lyofilisoitua ja lyofilisoimattomaa antigeeniä.

Tämän kokeen tulosten perusteella antigeenin lyofilisointi ei näytä juurikaan vaikuttavan näytteistä saataviin signaaleihin tai näytteiden C/V %-ihin (kuvat 28 ja 29).

Koska kehitettävän tuotteen loppukäyttäjä ei todennäköisesti käytä koko testipakkauksen antigeenimäärää yhdellä kerralla, testattiin antigeenin säilyvyyttä pakastettuna lyofilisaatin liuottamisen jälkeen. Lyofilisaatista liuotettu antigeeni säilytettiin kuukausi pakastettuna noin -22 °C:ssa ennen testaamista. Testaus tehtiin rinnan lyofilisoimattoman antigeenin kanssa kolmella IgM-negatiivisella ja kolmella IgM-positiivisella seerumäytteellä.



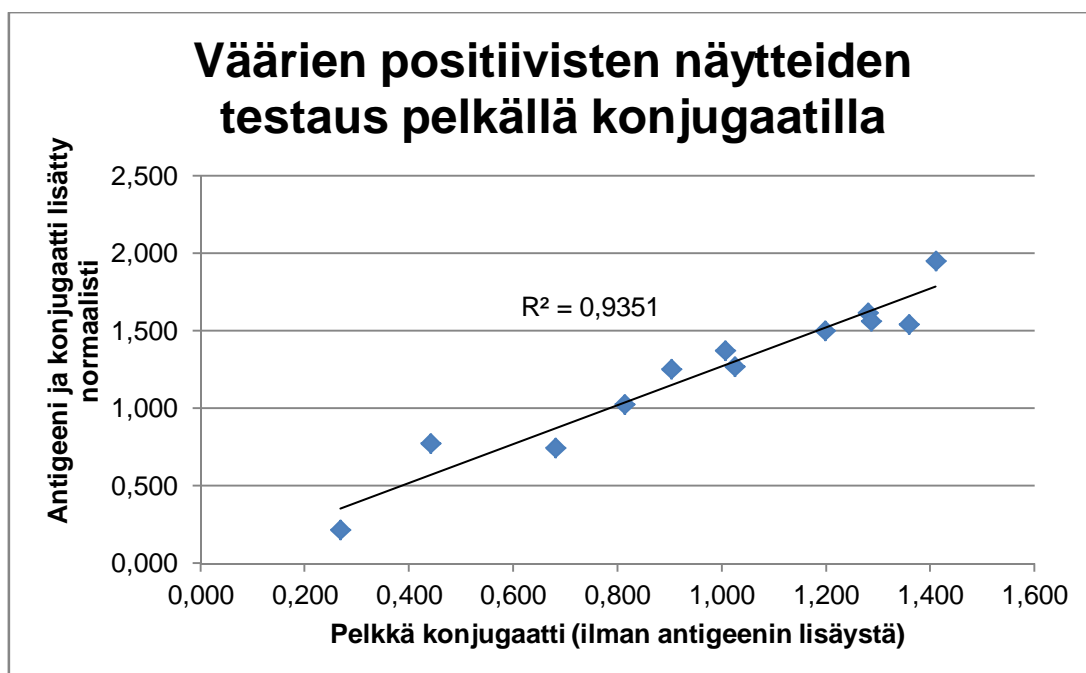
Kuva 30. Tulokset kokeesta, jossa lyofilisoitu antigeeni on liuotettu ja sitä on säilytetty noin kuukausi pakastimessa (noin -22 °C).

Lyofilisaatista liuotettun ja pakastetun antigeenin signaalit olivat pääsääntöisesti hieman matalampia kuin lyofilisoimattomien antigeenien. Signaalin pienestä laskusta huolimatta positiivisista näytteistä saatiin selkeästi positiivinen signaali. Tulosten perusteella todettiin, että lyofilisaatista liuotettu antigeeni säilyy käyttökelpoisena pakastettuna ainakin kuukauden ajan. (Kuva 30).

7.2.5 Vertailu kilpailijoiden testeihin ja väärät positiiviset tulokset

Labsystems-serumivarastoista seulottuja näytteitä testattaessa rinnakkain kehitettävällä testillä ja kahden kilpailijan testillä (Biotrin ja Euroimmun), huomattiin, että 11:stä seruminäytteellä saatiin väärä positiivisia tuloksia. Kehitettävällä testillä näytteet olivat selkeästi positiivisia, mutta molempien kilpailijan testillä kaikki näytteet olivat selkeästi negatiivisia. Kun testattiin muutamaa tunnettua näytettä (taulukko 1) rinnan Biotrinin B19V-IgM-testin kanssa, niin saatiin täysin yhteneviä tuloksia.

Väärää positiivista signaalia antavat näytteet testattiin vielä siten, että näyteinkubaation jälkeen testikaivoihin lisättiin vain avidiini-HRP-konjugaatti ilman antigeeniä. Tulosten perusteella havaittiin, että kaikilla näistä 11 näytteestä saatiin sama tulos riippumatta siitä lisättiinkö testikaivoon antigeeniä vai ei. (kuva 31; liite 6). Sama koe toistettiin samanlaisin tuloksin. Nämä tulokset viittaavat vahvasti siihen, että konjugaatin avidiini kiinnittyy epäspesifisesti johonkin näiden 11:sta seruminäytteen sisältämään molekyyliin.



Kuva 31. Tulokset kokeesta, jossa 11 väärää positiivista signaalia antavaa näytettä testattiin inkuboimalla pelkästään konjugaattia, ilman lisättyä antigeeniä. Testaukseen käytetyt seruminäytteet ja niiden signaalit on esitetty liitteessä 6.

7.2.6 Väärien positiiviset näytteet ja streptavidiini-konjugaatti

Kun näytelaimennosliuokseen tehdyistä muutoksista huolimatta väärät positiiviset näytteet antoivat edelleen positiivista signaalia, kokeiltiin työn alkuvaiheessa hylätyn streptavidiini-HRP-konjugaatin toimintaa uudelleen. Streptavidiinin tiedetään sitoutuvan vähemmän epäspesifisesti kuin avidiinin (Agudelo ym. 2000; Wood ym. 1981). Koska ensimmäisellä kerralla streptavidiini-konjugaatilla oli ollut ongelmana liiallinen signaali pelkällä näytelaimennospuskurilla, tehtiin siitä laimennossarja. Laimentamalla streptavidiini-konjugaattia tarpeeksi, pelkän näytelaimennospuskurin signaali saatiin laskemaan tarpeeksi alhaiselle tasolle. Positiivisten näytteiden signaali pysyi siitä huolimatta hyvänä.

Streptavidiini-HRP-konjugaatilla saatiin 11:stä väärää positiivista signaalia antavasta näytteestä kolme putoamaan negatiivisien puolelle. Vaihtamalla vielä streptavidiini-HRP-konjugaatti toisen valmistajan vastaavaan tuotteeseen, päästiin eroon kaikista vääristä positiivisista tuloksista. Tulosten perusteella eri valmistajien streptavidiini-HRP-konjugaattien välillä on huomattavia eroja. Tähän insinööriyöhön ei keritty testaamaan koko tunnettujen näytteiden paneelia (taulukko 1) käyttäen sen valmistajan streptavidiini-HRP-konjugaattia, jolla kaikista vääristä positiivisista reaktioista päästiin eroon.

7.2.7 Kontrolliseeruminäytteet

Yhdestäkään tämän insinööriyön aikana Labsystemsien seerumivarastoista testatusta noin 120 näytteestä ei löydetty IgM-vasta-aineita parvorokkovirukselle.

8 Yhteenveto

8.1 IgG-testi

Työn aikana vaihdettiin taustaa vähentävä blokkausliuos aluksi D-liuoksesta B-liuokseen ja lopuksi B-liuoksesta takaisin D-liuokseen. Vaikka erilaisia blokkausliuoksia testattiin monta erilaista, ei niitä kuitenkaan testattu riittävällä määrällä eri näytteitä. Ongelmat tulivat esiin työn edetessä, kun testattiin valmistettuja levyjä useammalla näytteellä ja suuremmalla määrällä rinnakkaisia testikaivoja. Toisaalta käytössä olleen antigeenin määrä oli rajallinen, joten useammalla näytteellä testattaessa olisi testattujen blokkausliuosten määrä ollut pienempi. Myös kontrollinäytteiden laimennospuskuria testattaessa olisi voinut käyttää useampaa näytettä. Valitun kontrollipuskurin toimivuus testattiin vain niillä näytteillä, joita ajateltiin käytettävän kontrolleina, koska muita näytteitä ei kontrollilaimennospuskuriin laimenneta. Konjugaatin alustavassa säädössä ennen kilpailijoiden testeihin vertaamista olisi voinut myös käyttää useampaa laimennospistettä. Vaikka sopiva laimennoskerroin löydettiin kolmen pisteen sisältä, olisi esimerkiksi viidellä pisteellä tehdyn mittauksen tulokset olleet kolmea pistettä luotettavammat.

B19V-IgG-ELISA-testi saatiin toimimaan hyvin Labsystemsien reagensseilla ja tuotantomenetelmillä. Vertailu markkinajohtaja Biotrinin sekä Euroimmunin testeihin osoittivat, että tässä työssä kehitetty IgG-testi toimii ainakin yhtä hyvin kuin markkinoilla jo olevat testit. Virion/Serionin testillä saadut, muista testeistä poikkeavat, tulokset miellettiin ennemminkin Virion/Serionin testin erottelukyvyn huonoudeksi kuin toisinpäin. Huomionarvoista kehitetyllä testillä oli mitattujen raja-arvosignaalien vähäisyys, joka osaltaan kertoo sen hyvästä erottelukyvystä.

Testilevyssä käytettävät valmistusmateriaalit, kuten taustaa vähentävä blokkausliuos, valittiin lopullisesti vasta työn loppupuolella, joten testilevyn ja testimenetelmän suorittamiseen käytettävien liuosten säilyvyydestä ei tähän insinööriyöhön saatu tuloksia. Alustavat testit levyn säilyvyydestä näyttävät kuitenkin hyvältä. Suurimmasta osasta käytettyjä liuoksia on jo olemassa tietoa niiden säilyvyydestä, koska niitä käytetään muissa Labsystemsien ELISA-testeissä.

B19V-IgG-ELISA-testin tuotekehitys saatiin päätökseen. Tämän insinööriyön jälkeen projekti jatkuu säilyvyyden seurantatesteillä ja validointierien valmistuksella.

8.2 IgM-testi

B19V-IgM-testiä ei saatu aivan valmiiksi tämän insinööriyön puitteissa. Kaikki näytti toimivan hyvin, kunnes varmistamattomia näytteitä testattiin rinnakkain kehitettävällä testillä ja kahden kilpailijan testillä. Labsystemsien seerumivarastoista testatuista 120 seeruminäytteestä, yhdestätoista saatiin väärä positiivinen tulos. Tulokset viittaavat voimakkaasti siihen, että käytetyn konjugaatin avidiini tarttuu epäspesifisesti johonkin näissä 11 seeruminäytteessä, sillä tulokset olivat samoja riippumatta siitä lisättiinkö testikaivoihin antigeeniä vai ei.

Streptavidiini-HRP-konjugaatilla saatiin vähennettyä väärin positiivisten määrää kolmella, mutta silti kahdeksasta näytteestä saatiin vielä positiivinen signaali. Lopuista vääristä positiivisista signaaleista päästiin eroon vaihtamalla streptavidiini-HRP-konjugaatin valmistajaa. Eri valmistajien streptavidiini-HRP-konjugaattien välillä oli yllättävän suuria eroja. Kolmelta eri valmistajalta testatuista streptavidiini-HRP-konjugaatista vain yhdellä kaikki väärä positiivisia antaneet seeruminäytteet olivat negatiivisia. Muiden valmistajien streptavidiini-HRP-konjugaateilla, suurimmasta osasta kyseisiä näytteitä, saatiin positiivinen signaali.

Lyofilisoitujen antigeenien toimivuutta ei keritty testaamaan kovin laajasti johtuen konjugaatin kanssa koetuista ongelmista. Lyofilisoinnin vaikutusta testattiin muutamalla positiivisella ja negatiivisella näytteellä, mutta sitä ei keritty testaamaan koko tunnettujen näytteiden paneelilla. Ennen testin valmistumista täytyy siis vielä varmistaa lyofilisoidun antigeenin toiminta suuremmalla määrällä näytteitä ja eri antigeenierillä.

Konjugaattien kanssa koetuista pienistä ongelmista huolimatta, tunnetuilla näytteillä testattaessa, tulokset korreloivat hyvin yhteistyölaboratorion tulosten kanssa. Myös testikaivojen väliset C/V %:t olivat koko tuotekehitysprojektin ajan erittäin hyviä. Tähän insinööriyöhön ei IgM-testin kehityksestä keritty saamaan enempää tuloksia. Näyttää kuitenkin siltä, että väärin positiivisten tulosten ongelma on saatu ratkaistua. IgM-testin kehitystyötä jatketaan kunnes se on valmis markkinoille.

Lähteet

Agudelo S., Portùs M. 2000: *Leishmania* Antigen Nonspecific Binding to Avidin in Biotin-Avidin Immunoassays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7, s. 171-718.

Alanen A., Kahala K., Vahlberg T., Koskela P., Vainionpää R. 2005: Seroprevalence, incidence of prenatal infection and reliability of maternal history of varicella zoster virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus and Parvovirus B19 infection in South-Western Finland. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 112, s. 50-56.

Allander T., Tammi M. T., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A., Andersson B. 2005: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102, s. 12891-12896.

Anderson L. J., Tsou C., Parker R. A., Chorba T. L., Wulff H., Tattersall P., Mortimer P. P. 1986: Detection of Antibodies and Antigens of Human Parvovirus B19 by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology* 24, s. 522-526.

Anderson M. J., Lewis E., Kidd I. M., Hall S. M., Cohen B. J. 1984: An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *The Journal of Hygiene* 93, s. 85-93.

Anderson M. J., Higgins P. G., Davis L. R., Willman J. S., Jones S. E., Kidd I. M., Pattison J. R., Tyrrell D. A. J. 1985: Experimental Parvoviral Infection in Humans. *The Journal of Infectious Diseases* 152, s. 257-265.

Arthur J. L., Higgins G. D., Davidson G. P., Givney R. C., Ratcliff R. M. 2009: A Novel Bocavirus Associated with Acute Gastroenteritis in Australian Children. *PLoS Pathogens*, 5, s. 1-11.

Blümel J., Eis-Hübinger A. M., Stühler A., Bönsch C., Gessner M., Löwer J. 2005: Characterization of Parvovirus B19 Genotype 2 in KU812Ep6 Cells. *Journal of Virology* 79, s. 14197-14206.

Brown C. S., Salimans M. M. M., Noteborn M. H. M., Weiland H. T. 1990: Antigenic parvovirus B19 coat proteins VP1 and VP2 produced in large quantities in a baculovirus expression systems. *Virus Research* 15, s. 197-212.

Brown C. S., Van Lent J. W. M., Vlak J. M., Spaan W. J. M. 1991: Assembly of Empty Capsids by Using Baculovirus Recombinants Expressing Human Parvovirus DNA in Bone Marrow. *Journal of Medical Virology* 53, s. 229-232.

Cartter M. L., Farley T. A., Rosengren S., Quinn D. L., Gillespie S. M., Gary G. W., Hadler J. L. 1991: Occupational Risk Factors for Infection with Parvovirus B19 among Pregnant Women. *The Journal of Infectious Diseases* 163, s. 282-285.

Cossart Y. E., Field A. M., Cant B., Widdows D. 1975: Parvovirus-like particles in human sera. *The Lancet* 1, s.72-73

Cotmore S. F., McKie V. C., Anderson L. J., Astell C. R., Tattersall P. 1986: Identification of the Major Structural and Nonstructural Proteins Encoded by Human Parvovirus B19 and Mapping of Their Genes by Prokaryotic Expression of Isolated Genomic Fragments. *Journal of Virology*, 60, s. 548-557.

Cubie H. A., Leslie E. E., Smith S., O'Neill H. J., Cohen B. J., Inglis J. M. 1993: Use of recombinant human parvovirus B19 antigens in serological assays. *Journal of Clinical Pathology*, volume 46, issue 9, s. 840-845.

de Jong E. P., de Haan T. R., Kroes A. C. M., Beersma M. F. C., Oepkes D., Walther F. J. 2006: Parvovirus B19 infection in pregnancy. *Journal of Clinical Virology*, 36, s. 1-7.

Deiss V., Tratschin J., Weitz M., Siegl G. 1990: Cloning of the Human Parvovirus B19 Genome and Structural Analysis of Its Palindromic Termini. *Virology*, 175, s. 247-254.

Ekman A., Hokynar K., Kakkola L., Kantola K., Hedman L., Bondén H., Gessner M., Aberham C., Norja P., Miettinen S., Hedman K., Söderlund-Venermo M. 2007: Biological and Immunological Relations among Human Parvovirus B19 Genotypes 1 to 3. *American Society of Microbiology* 81, s. 6927-6935.

Enders M., Weidner A., Zoellner I., Searle K., Enders G. 2004: Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenatal Diagnosis* 24, s. 513-518.

Enders M., Schalasta G., Baisch C., Weidner A., Pukkila L., Kaikkonen L., Lankinen H., Hedman L., Söderlund-Venermo M., Hedman K. 2006: Human Parvovirus B19 infection during pregnancy – Value of modern molecular and serological diagnostics. *Journal of Clinical Virology* 35, s. 400-406.

Enders M., Weidner A., Rosenthal T., Baisch C., Hedman L., Söderlund-Venermo M., Hedman K. 2008: Improved Diagnosis of Gestational Parvovirus B19 Infection at the Time of Nonimmune Fetal Hydrops. *The Journal of Infectious Diseases* 197, s. 58-62.

Engvall E., Perlmann P. 1971: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) – Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, s. 871-874.

Erdman D. D., Anderson B. C., Török T. J., Finkel T. H., Anderson L. J. 1997: Possible Transmission of Parvovirus B19 From Intravenous Immune Globulin. *Journal of Medical Virology* 53, s. 223-236.

Hansen K., Pii K., Lebech A. M. 1991: Improved immunoglobulin M serodiagnosis in Lyme borreliosis by using a μ -capture enzyme-linked immunosorbent assay with biotinylated *Borrelia burgdorferi* flagella. *Journal of Clinical Microbiology*, volume 29, issue 1, s. 166-172.

Hayat M. A. 2006. Selected definitions. Teoksessa: Hayat M. A. (ed.) *Handbook of Immunocytochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas*, volume 4. Elsevier academic press, London.

Heegaard E. and Brown K. 2002: Human parvovirus B19. *Clinical Microbiology Reviews* 15, s. 485-505.

Heegaard E., Qvortrup K., Christensen J. 2002: Baculovirus Expression of Erythrovirus V9 Capsids and Screening by ELISA: Serologic Cross-Reactivity With Erythrovirus B19. *Journal of Medical Virology* 66, s. 246-252.

Hokynar Kati 2007: Human parvovirus B19: Tissue persistence and prevalence of prototypic and new variants. Helsinki: Helsinki University Printing House.

Hokynar K., Burnstein J., Söderlund-Venermo M., Kiviluoto O., Partio E. K., Kontinen Y., Hedman K. 2000: Integrity and full coding sequence of B19 virus DNA persisting in human synovial tissue. *Journal of General Virology* 81, s. 1017-1025.

Hokynar K., Söderlund-Venermo M., Pesonen M., Ranki A., Kiviluoto O., Partio E. K., Hedman K. 2002: A New Parvovirus Genotype Persistent in Human Skin. *Virology* 302, s. 224-228.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2011. *Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Andrew MQ King, Elliot Lefkowitz, Michael J. Adams, Eric B. Carstens (ed.). Published by Elsevier Inc.

Jordan J. A., DeLoia J. A. 1999: Globoside Expression Within the Human Placenta. *Placenta*, volume 20, issue 1, s. 103-108.

Kaikkonen L., Lankinen H., Harjunpää I., Hokynar K., Söderlund-Venermo M., Oker-Blom C., Hedman L., Hedman K 1999: Acute-Phase-Specific Heptapeptide Epitope for Diagnosis of Parvovirus B19 Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 37, s. 3952-3956.

Kajigaya S., Shimada T., Fujita S., Young N. S. 1989: A Genetically Engineered Cell Line that Produces Empty Capsids of B19 (human) Parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 86, s. 7601-7605.

Kajigaya S., Fujii H., Field A., Anderson S., Rosenfeld S., Anderson L. J., Shimada T., Young N. S. 1991: Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus systems, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 88, s. 4646-4650.

Kapoor A., Slikas E., Simmonds P., Chieochansin T., Naeem A., Shaukat S., Masroor Alam M., Sharif S., Anges M., Zaidi S., Delwart E. 2009: A New Bocavirus Species in Human Stool. *The Journal of Infectious Diseases* 199, s. 196-200.

Kapoor A., Simmonds P., Li L., Bodhidatta L., Sethabutr O., Triki H., Bahri H., Oderinde B., Baba M., Bukbuk D., Besser J., Bartkus J., Delwart E. 2010: Human Bocaviruses are Highly Diverse, Dispersed, Recombination Prone and Prevalent Enteric Infections. *The Journal of Infectious Diseases* 201, s. 1633-1643.

Kawase M., Momoeda M., Young N. S., Kajigaya S. 1995: Most of the VP1 Unique Region of B19 Parvovirus Is on the Capsid Surface. *Virology*, 211, s. 359-366.

Koch W. C. 1995: A synthetic parvovirus B19 capsid protein can replace viral antigen in antibody-capture enzyme immunoassays. *Journal of Virological Methods* 55, s. 67-82.

Meriluoto Mira 2009: Parvorokkovirusinfektion yleisyys raskauden aikana. Insinööritö, Metropolia Ammattikorkeakoulu.

Moffatt S., Yaegashi N., Tada K., Tanaka N., Sugamura K. 1998: Human Parvovirus B19 Nonstructural (NS1) Protein Induced Apoptosis in Erythroid Lineage Cells. *Journal of Virology* 72, s. 3018-3028.

Nguyen Q. T., Sifer C., Schneider V., Allaupe X., Servant A., Bernaudin F., Auguste V., Garbarg-Chenon A. 1999: Novel Human Erythrovirus Associated With Transient Aplastic Anemia. *Journal of Clinical Microbiology* 37, s. 2483-2487.

Nguyem Q. T., Wong S., Heegaard E., Brown K. 2002: Identification and Characterization of a Second Novel Human Erythrovirus Variant, A6. *Virology* 301, s. 374-380.

Norja Päivi 2012: Prevalence and evolution of human parvoviruses. Helsinki.

Norja P., Hokynar K., Aaltonen M., Chen R., Ranki A., Partio E. K., Kiviluoto O., Davidkin I., Leivo T., Eis-Hübinger A. M., Schneider B., Fischer H., Tolba R., Vapalahti O., Vaheri A., Söderlund-Venermo M., Hedman K. 2006: Bioportfolio: Lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103, s. 7450-7453.

Ozawa K., Kurtzman G., Young N. 1986: Replication of the B19 Parvovirus in Human Bone Marrow Cell Cultures. *Science*, 233, s. 883-886.

Ozawa K., Ayub J., Yu-Shu H., Kurtzman G., Shimada T., Young N. 1987: Novel Transcription Map for the B19 (Human) Pathogenic Parvovirus. *Journal of Virology*, 61, s. 2395-2406.

Ozawa K., Young N. 1987: Characterization of Capsid and Noncapsid Proteins of B19 Parvovirus Propagated in Human Erythroid Bone Marrow Cell Cultures. *Journal of Virology*, 61, s. 2627-2630.

Pattison J. R., Jones S. E., Hodgson J., Davis L. R., White J.M., Stroud C. E., Murtaza L. 1981: Parvovirus infection and hypoplastic crisis in sickle-cell anemia. *The Lancet* 1, s. 664-665.

Poole B. D., Karetnyi Y. V., Naides S. J. 2004: Parvovirus B19-Induced Apoptosis of Hepatocytes. *Journal of Virology* 78, s. 7775-7783.

Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease 1990: Prospective Study of Human Parvovirus (B19) Infection in Pregnancy. *British Medical Journal* 300, s. 1166-1170

Reid D. M., Reid T. M. S., Brown T., Rennie J. A. N., Eastmond C. J. 1985: Human Parvovirus-associated Arthritis: a Clinical and Laboratory Description. *The Lancet* 1, s. 422-425.

Sanabani S., Neto W. K., Pereira J., Sabino E. C. 2006: Sequence Variability of Human Erythroviruses Present in Bone Marrow of Brazilian Patients with Various Parvovirus B19-Related Hematological Symptoms. *Journal of Clinical Microbiology* 44, s. 604-606

Sánchez-Rodríguez S. P., Münch-Anguiano L., Echeverría O., Vázquez-Nin G., Mora-Pale M., Dordick J., S., Bustos-Jaimes I. 2012: Human Parvovirus B19 virus-like particles: *In vitro* assembly and stability. *Biochemie*, 94, s. 870-878.

Searle K., Guilliard C., Enders G. 1997: Parvovirus B19 Diagnosis in Pregnant Women - Quantification of IgG Antibody Levels (IU/ml) with Reference to the International Parvovirus B19 Standard Serum. *Infection*, volume 25, issue 1, s. 32-34.

Servant A., Laperche S., Lallemand F., Marinho V., De Saint Maur G., Meritet J. F., Garbarg-Chenon A. 2002: Genetic Diversity within Human Erythroviruses: Identification of Three Genotypes. *Journal of Virology* 76, s. 9124-9134

Söderlund M., Brown C., Cohen B., Hedman K 1995a: Accurate Serodiagnosis of B19 Parvovirus Infections by Measurement of IgG Avidity. *The Journal of Infectious Diseases* 171, s. 710-713.

Söderlund M., Brown C., Spaan W., Hedman L., Hedman K 1995b: Epitope Type-Specific IgG Responses to Capsid Proteins VP1 and VP2 of Human Parvovirus B19. *The Journal of Infectious Diseases* 172, s. 1431-1436.

Söderlund Maria 1996: Human parvovirus B19 – Development and application of new diagnostic methods based on molecular immunology and PCR. Helsinki: Hakapaino.

Tolfvenstam T., Papadogiannakis N., Norbeck O., Petersson K., Broliden K. 2001: Frequency of human parvovirus B19 infection in intrauterine fetal death. *Lancet* 357, s. 1494-1497.

Valeur-Jensen A., Pedersen C., Westergaard T., Jensen I., Lebech M., Andersen P., Aaby P., Pedersen B., Melbye M. 1999: Risk factors for parvovirus B19 infection in pregnancy. *Jama* 281, s. 1099-1105.

White D. G., Woolf A. D., Mortimer P. P, Cohen B. J., Blake D. R., Bacon B. A. 1985: Human Parvovirus Arthropathy. *The Lancet* 1, s. 419-421.

Wood G. S., Warnke R. 1981: Suppression of endogenous avidin-biotin activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29, s. 1196-1204.

Wreghitt T. G., Sillis M. 1985: A μ -capture ELISA for *detecting Mycoplasma pneumoniae* IgM: comparison with indirect immunofluorescence and indirect ELISA. *The Journal of Hygiene*, volume 94, issue 2, s. 217-227.

Antigeenin testaus: seeruminäytteet ja mittaustulokset

Käytetyt seeruminäytteet ja omien mittaustulosten signaalit sekä yhteistyölaboratorion mittaustulokset samoista näytteistä. Yhteistyölaboratorion mittaustulokset luettiin positiiviseksi, jos signaali on yli 0,18 ja negatiiviseksi signaalin ollessa sen alle. Omat mittaustulokset olivat positiivisia, jos signaali oli yli 0,5 ja negatiivisia sen alle.

Seeruminäyte	Mitattu signaali (abs. 450 nm.)	Yhteistyölaboratorion mittaustulos
A1	0,51	0,166
A4	2,149	1,517
A5	2,908	2,165
A6	0,384	0,14
A7	2,94	2,044
A9	2,848	0,592
A10	2,061	2,019
A11	2,294	2,517
A12	0,313	0,067
A13	3,137	2,657
A14	2,788	2,317
A16	2,788	2,032
A19	2,94	2,376
A23	2,635	1,903
A24	0,145	0,022
A25	1,349	0,365
A26	1,462	0,665
A28	2,932	2,845
A29	2,397	0,461
A30	2,861	2,267
A31	2,823	2,358
A33	2,981	2,217
A34	0,119	0,062
A35	3,018	2,321
A36	2,508	2,197
A37	2,11	0,758
A38	2,08	1,209
A40	0,199	0,052
A41	2,411	1,422
A42	2,742	2,209
A43	0,766	0,404

A44	2,514	1,831
A45	2,684	1,963
A46	2,578	1,645
A47	0,242	0,08
A48	2,727	1,519
A50	0,154	0,033
A51	2,972	2,068
A52	2,923	2,297
A53	0,454	0,223
A55	2,802	2,738

IgG-HRP-konjugaatin vaihdon testaus: seeruminäytteet ja mittaustulokset

IgG-HRP-konjugaatin vaihdon testaukseen käytetyt seeruminäytteet ja niiden signaalit kummallakin konjugaatilla.

Seeruminäyte	Näytteiden signaalit (abs. 450 nm.)	
	Labsystems in IgG-HRP-konjugaatti	Dakon IgG-HRP-konjugaatti
A 4	1,959	2,149
A 5	2,908	2,908
A 7	2,949	2,941
A 9	2,123	2,848
A 10	1,821	2,061
A 11	1,817	2,294
A 13	2,731	3,137
A 14	1,834	2,788
A 16	2,040	2,788
A 19	2,753	2,936
A 23	2,513	2,635
A 24	0,112	0,145
A 25	1,786	1,349
A 26	1,412	1,462
A 28	2,779	2,932
A 29	2,605	2,397
A 30	2,709	2,861
A 31	2,096	2,823
A 34	0,222	0,119
A 35	2,840	3,018
A 36	1,884	2,508
A 38	2,024	2,080
A 41	1,747	2,411
A 43	0,800	0,766
A 44	2,416	2,514
A 45	2,337	2,684
A 46	2,056	2,578
A 47	0,168	0,242
A 48	2,605	2,727
A 50	0,136	0,154
A 52	2,505	2,923

IgG-HRP-konjugaatin säädön testaus: seeruminäytteet ja mittaustulokset

IgG-HRP-konjugaatin säädön testauksessa käytetyt seeruminäytteet ja saadut signaalit.

Seeruminäyte	Näytteiden signaalit (abs. 450 nm)	
	Konjugaattilaimennos 1:8000	Konjugaattilaimennos 1:15000
40N	1,505	0,319
H30	3,142	2,233
R400	0,995	0,349
H464	3,084	2,392
P595	2,596	0,811
2029	0,110	0,071
H478	2,851	1,235
H438	0,581	0,156
1459	0,227	0,109
1457	0,486	0,163
600	1,154	0,273
5202	0,613	0,197
1464	0,121	0,050
1571	0,152	0,054
1451	0,153	0,045
45N	0,201	0,057
1492	0,177	0,067
1603	0,129	0,058
H476	0,289	0,096
1559	0,084	0,033

IgG-testin vertailu kilpailijoiden vastaaviin testeihin

IgG-testin vertailussa kilpailijoiden testeihin käytetyt seeruminäytteet ja niistä saadut signaali / raja-arvo -suhdeluvut. Kehitettävässä testissä (taulukossa Labsystems), Biotrinin testissä ja Euroimmunin testissä suhdeluvun ollessa yli 1,1 pidetään näytettä positiivisena ja negatiivisena sen ollessa alle 0,9. Näiden lukujen välisiä arvoja pidetään raja-arvotuloksina. Virion/Serionin tulokset on määritetty valmistajan antamien ohjeiden mukaisesti.

Seeruminäyte	Signaali / raja-arvolla -suhdeluku	
	Labsystems (9.5.13)	Labsystems (30.8.13)
40N	2,77	2,05
H30	5,78	14,31
R400	1,83	2,24
H464	5,67	15,33
P595	4,77	5,20
2029	0,20	0,46
H478	5,24	7,92
H438	1,07	1,00
1459	0,42	0,70
1457	0,89	1,05
600	2,12	1,75
5202	1,13	1,26
1464	0,22	0,32
1571	0,28	0,35
1451	0,28	0,29
45N	0,37	0,37
1492	0,33	0,43
1603	0,24	0,37
H476	0,53	0,62
1559	0,16	0,21

Seeruminäyte	Signaali / raja-arvolla -suhdeluku		
	Biotrin	Euroimmun	Virion/Serion
40N	2,16	1,96	Positiivinen
H30	7,64	4,51	Positiivinen
R400	1,52	1,12	Positiivinen
H464	7,36	4,23	Positiivinen
P595	3,55	2,32	Negatiivinen
2029	0,28	0,56	Raja-arvo
H478	6,55	4,28	Positiivinen
H438	0,68	0,83	Positiivinen
1459	0,31	0,35	Raja-arvo
1457	0,94	0,59	Raja-arvo
600	1,81	1,30	Positiivinen
5202	2,33	1,31	Positiivinen
1464	0,44	0,23	Negatiivinen
1571	0,58	0,25	Negatiivinen
1451	0,45	0,45	Raja-arvo
45N	0,34	0,25	Raja-arvo
1492	0,26	0,24	Negatiivinen
1603	0,30	0,24	Negatiivinen
H476	0,57	0,80	Positiivinen
1559	0,87	0,35	Negatiivinen

IgM-testin antigeenin ja konjugaatin samanaikainen lisäys

IgM-testin antigeenin ja konjugaatin samanaikaisen lisäyksen testaamiseen käytetyt seeruminäytteet ja niiden signaalit verrattuna yhteistyölaboratorion mittaustuloksiin.

Seeruminäyte	Näytteiden signaali	
	Kehitettävän testin signaali	Yhteistyölaboratorion mittaustulokset
A4	1,145	1,114
A6	1,156	1,543
A10	0,914	0,471
A16	0,423	0,405
A19	1,065	0,85
A23	1,192	1,37
A28	0,219	0,053
A33	1,302	1,396
A40	0,869	1,342
A42	0,125	0,057
A43	0,939	1,284
A45	0,524	0,287
A46	0,137	0,028

IgM-testillä saatujen väärin positiivisten näytteiden mittaustuloksia

Näytteiden signaalit (abs. 450 nm.)		
Seeruminäyte	Pelkkä konjugaatti	Antigeeni + konjugaatti
T151	1,358	1,544
T207	1,198	1,500
T58	1,025	1,270
H450	1,410	1,951
T116	0,813	1,026
1559	1,280	1,619
T157	1,006	1,375
33N	1,286	1,563
T154	0,903	1,254
H442	0,441	0,776
H89	0,268	0,216
53N	0,680	0,744